

# VITAMIN-B6-STOFFWECHSEL BEI NIERENSTEINPATIENTEN UND GESUNDEN IM VERGLEICH

BASALWERTE, VITAMIN-B6-BELASTUNG UND  
PROTEINBELASTUNG

**Inauguraldissertation**

zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie  
vorgelegt der  
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von

Agnes Kälin Aebi

aus Einsiedeln, Kanton Schwyz,  
und Aetingen, Kanton Solothurn

Basel, 2006

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
auf Antrag von

Herrn Prof. Dr. F. Brunner

Herrn Prof. Dr. Ph. Jaeger

Herrn Prof. Dr. W. Schaffner

Basel, den 02. Mai 2006

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz

Dekan

*meinen Eltern*



## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Kalzium-Phosphat-Labor der Medizinischen Universitätspoliklinik, Inselspital Bern, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ph. Jaeger, Direktor und Chefarzt, durchgeführt.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Ph. Jaeger danken, dass ich in seinem Labor arbeiten und meine Doktorarbeit bei ihm schreiben durfte. Danken möchte ich ihm für seine mannigfaltige Unterstützung, sein Vertrauen und den mir dadurch gewährten Freiraum. Danken möchte ich aber auch für die Teilnahme an zahlreichen Tagungen und Kongressen im In- und Ausland, wo ich meine Arbeit mehrmals einem breiten Publikum vorstellen durfte. Ich habe unter seiner Obhut viel gelernt.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Brunner, Abteilung für Nephrologie, Kantonsspital Basel, für seine Bereitschaft und seine Tätigkeit als Korreferent.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schaffner, Pharmazeutisches Institut, Universität Basel, für seine Bereitschaft und Tätigkeit als Fakultätsverantwortlicher.

Danken möchte ich Herrn Dr. Q.-V. Nguyen, Einheit für Osteoporose, Inselspital Bern, für seine Arbeit im Zusammenhang mit der Proteinbelastung. Danken möchte ich auch Herrn Dr. J.-P. Casez, Einheit für Osteoporose, Inselspital Bern, für seine aktive Mitarbeit bei Vorträgen und Publikationen sowie beim Zeichnen von Graphiken. Danken möchte ich aber auch all jenen Ärztinnen und Ärzten des Ambulatoriums, die für mich Patienten informiert und rekrutiert haben.

Danken möchte ich speziell den Laborantinnen des Kalzium-Phosphat-Labors, Frau K. Farina, Frau G. Haueter, Frau R. Mosimann, Frau R. Takkinen und Frau A. Vaucher, die mich in ihren Kreis aufgenommen haben und ohne deren unermüdliche Mitarbeit diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Danken möchte ich meinem Ehemann, Robert Aebi, für die Organisation und Leitung des Nachdiplomkurses in angewandter Statistik und seine liebevolle Unterstützung in Zeiten, die nicht immer einfach waren.

Herzlich danken möchte ich nicht zuletzt meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und motiviert haben, und auf deren Beistand ich tagein, tagaus zählen darf.

# I. INHALTSVERZEICHNIS

## I. INHALTSVERZEICHNIS

## II. LISTE DER ABKÜRZUNGEN

## III. LISTE DER ABBILDUNGEN

## IV. LISTE DER TABELLEN

1	EINLEITUNG .....	1
2	DAS NIERENSTEINLEIDEN - EIN ÜBERBLICK.....	3
1	EINLEITUNG .....	3
2	DAS NIERENSTEINLEIDEN IM ENGEREN SINNE.....	3
2.1	HÄUFIGKEIT .....	3
2.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE .....	3
2.2.1	Formale Genese.....	4
2.2.2	Kausale Genese .....	4
2.3	KONKREMENTANALYSE UND ZUSAMMENSETZUNG.....	4
2.4	RISIKOFAKTOREN .....	5
2.4.1	Tiefes Urinvolumen .....	5
2.4.2	Hyperoxalurie .....	5
2.4.3	Hyperkalziurie.....	7
2.4.4	Hyperurikosurie .....	8
2.4.5	Hypoziaturie / Inkomplette renal-tubuläre Azidose.....	8
2.5	WEITERE BEEINFLUSSENDE FAKTOREN .....	8
2.5.1	Diät / Proteinzufuhr .....	9
2.5.2	Tamm-Horsfall-Glycoprotein (THP).....	9
2.5.3	Magnesium .....	9
2.5.4	Glykolat.....	9
2.5.5	Vitamin C.....	9
2.6	EINSCHÄTZUNG DES STEINBILDUNGSRISIKOS .....	10
2.6.1	Das molare Produkt von Kalzium x Oxalat.....	10
2.6.2	Der Kalzium/Magnesium-Quotient .....	10
2.6.3	Der Kalzium/Oxalat-Quotient.....	10
2.7	REZIDIVPROPHYLAXE UND THERAPIEMÖGLICHKEITEN.....	11
2.7.1	Allgemeine Massnahmen .....	11
2.7.2	Phytopharmaka .....	11
2.7.3	Medikamentöse Therapie.....	11
3	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	12
3	VITAMIN B6 - PYRIDOXIN.....	14
1	EINLEITUNG .....	14
2	VITAMIN B6 IM ENGEREN SINNE.....	14
2.1	NOMENKLATUR GEMÄSS DEN REGELN DER IUPAC .....	14
2.2	VORKOMMEN VON VITAMIN B6 .....	15

2.3	CHEMISCH / PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON PYRIDOXINHYDRO- CHLORID .....	15
2.3.1	Synonyme .....	15
2.3.2	Strukturformel .....	16
2.3.3	Summenformel .....	16
2.3.4	Molekulargewicht .....	16
2.3.5	Eigenschaften .....	16
2.3.6	Löslichkeit .....	16
2.3.7	Schmelzpunkt .....	16
2.3.8	Stabilität .....	16
2.3.9	Inkompatibilitäten .....	16
2.3.10	Handelsnamen .....	17
2.4	EIGENSCHAFTEN / WIRKUNGEN .....	17
2.5	PHARMAKOKINETIK .....	17
2.5.1	Absorption .....	17
2.5.2	Distribution / Metabolismus .....	17
2.5.3	Elimination .....	18
2.6	INDIKATIONEN / ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN .....	19
2.7	DOSIERUNG / ANWENDUNG .....	19
2.7.1	Übliche Dosierung .....	19
2.7.2	Anwendung .....	19
2.8	ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN .....	19
2.8.1	Kontraindikationen .....	19
2.8.2	Vorsichtsmassnahmen .....	19
2.8.3	Schwangerschaft / Stillzeit .....	20
2.9	UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN .....	20
2.10	INTERAKTIONEN .....	20
2.11	HYPOVITAMINOSE .....	20
2.12	ANTAGONISTEN .....	20
2.13	ÜBERDOSIERUNG / HYPERVITAMINOSE .....	21
2.14	TOXIZITÄT / TOXIKOLOGIE .....	21
2.15	BESTIMMUNGSMETHODEN .....	22
3	VITAMIN B6 UND OXALAT .....	22
3.1	ANGRIFFSORT VON VITAMIN B6 IM OXALATSTOFFWECHSEL .....	22
3.2	ALLGEMEINE HYPOTHESE DER HYPEROXALURIE BEI VITAMIN-B6-MANGEL .....	22
3.3	PRÄKLINISCHE STUDIEN .....	23
3.3.1	Studien im Zusammenhang mit einem Vitamin-B6-Mangel .....	23
3.3.2	Studien mit Vitamin-B6-Supplementation .....	23
3.4	KLINISCHE STUDIEN DURCHGEFÜHRT AM MENSCHEN .....	24
3.4.1	Vitaminzufuhr und Risiko eines Nierensteinleidens .....	24
3.4.2	Studien mit Vitamin-B6-Supplementation .....	24
3.4.3	Studien mit Vitamin-B6-Supplementation in Kombination mit Magnesiumoxid .....	29
3.4.4	Studien mit Vitamin-B6-Supplementation in Kombination mit mehreren Komponenten (Magurlit®) .....	30
3.4.5	Zusammenhang zwischen der 4-Pyridoxinsäure und der Oxalat-ausscheidung .....	30
4	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	31
4	PROJEKTE .....	33
4.1	ENTWICKLUNG EINER MESSMETHODE FÜR PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND 4-PYRIDOXINSÄURE .....	33
1	ZUSAMMENFASSUNG .....	33
2	EINLEITUNG .....	33

3	MATERIAL UND METHODEN .....	36
3.1	STABILITÄT VON B6-VITAMEREN .....	36
3.2	GERÄTE .....	36
3.3	TRENNSÄULEN .....	38
3.4	REAGENTIEN UND CHEMIKALIEN.....	38
3.5	LÖSUNGSMITTEL.....	39
3.5.1	Elutionsmittel.....	39
3.5.2	Post-Säulen-Puffer .....	39
3.5.3	Post-Säulen-Lösung.....	39
3.5.4	Standardlösungen .....	39
3.5.5	Interner Standard .....	39
3.5.6	Weitere Lösungen .....	40
3.6	DURCHFÜHRUNG EINER ANALYSE.....	40
3.6.1	P5'P.....	40
3.6.2	4-PA basal.....	40
3.6.3	4-PA nach Vitamin-B6-Belastung.....	40
3.7	MATERIALZUBEREITUNG .....	40
3.7.1	P5'P.....	40
3.7.2	4-PA basal.....	41
3.7.3	4-PA nach Vitamin-B6-Belastung.....	41
3.8	HERSTELLUNG EINER STANDARDREIHE.....	41
3.8.1	P5'P.....	41
3.8.2	4-PA .....	41
3.9	LINEARITÄT DER STANDARDKURVE .....	42
3.10	BERECHNUNG DER KONZENTRATION .....	42
3.11	VERIFIZIERUNG DER PEAK-IDENTITÄT.....	42
3.12	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN WELLENLÄNGEN .....	43
3.13	PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT .....	43
3.14	RECOVERY - WIEDERFINDUNG .....	43
4	ERGEBNISSE .....	43
5	DISKUSSION .....	49

4.2	VITAMIN-B6-BELASTUNG VON NIERENSTEINPATIENTEN UND GESUNDEN FREIWILLIGEN.....	52
1	ZUSAMMENFASSUNG .....	52
2	EINLEITUNG .....	53
3	MATERIAL UND METHODEN .....	54
3.1	PRÜFUNGSANLAGE.....	54
3.1.1	Prüfungsdesign .....	54
3.1.2	Prüfmaterial .....	54
3.1.3	Dosierung.....	54
3.1.4	Behandlungsdauer .....	54
3.2	WIRKSTOFF-CHARAKTERISIERUNG.....	54
3.3	AUSWAHL DER PATIENTEN.....	54
3.3.1	Rekrutierung.....	54
3.3.2	Einschlusskriterien .....	54
3.3.3	Ausschlusskriterien .....	55
3.3.4	Begleitmedikation .....	55
3.3.5	Frühere Medikation .....	55
3.4	AUSWAHL DER PROBANDEN .....	55
3.4.1	Rekrutierung.....	55
3.4.2	Einschlusskriterien .....	56
3.4.3	Ausschlusskriterien .....	56
3.4.4	Begleitmedikation .....	56
3.4.5	Frühere Medikation .....	56
3.5	DURCHFÜHRUNG DER VITAMIN-B6-BELASTUNG.....	56
3.5.1	Ausgangswerte.....	56
3.5.2	Vitamin-B6-Belastung.....	56



3.6	ANZAHL DER PATIENTEN BZW. PROBANDEN .....	57
3.6.1	Basal .....	57
3.6.2	Vitamin-B6-Belastung.....	57
3.7	MATCHING.....	57
3.8	BEURTEILUNGSPARAMETER .....	57
3.8.1	Probensammlung und -aufbereitung.....	57
3.8.2	Analysenmethoden.....	58
3.8.3	Unerwünschte Wirkungen.....	59
3.8.4	Compliance .....	59
3.9	ABBRUCH UND ABSCHLUSS DER KLINISCHEN STUDIE .....	59
3.10	DROP-OUT'S.....	59
3.11	RANDOMISIERUNG UND VERBLINDUNG .....	59
3.12	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	59
3.13	INFORMATION DES PATIENTEN / PROBANDEN ÜBER DIE PERSÖNLICHEN ERGEBNISSE.....	60
3.14	BEURTEILUNG DES RISIKO / NUTZEN-VERHÄLTNISSES VOR BEGINN DER STUDIE.....	60
3.15	ETHISCHE ÜBERLEGUNGEN .....	60
3.16	WRITTEN INFORMED CONSENT .....	61
3.17	FINANZIELLE REGELUNG.....	61
3.18	VERSICHERUNGEN / HAFTUNG .....	61
3.19	DATENSCHUTZ .....	62
3.20	VERANTWORTUNGSBEREICHE .....	62
3.21	MEDIZINISCH-ETHISCHER KONSENS .....	62
4	ERGEBNISSE .....	62
4.1	URINPARAMETER VON PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN VOR DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	62
4.1.1	Vergleich der drei Gruppen .....	62
4.1.2	Lineare Beziehungen der 4-Pyridoxinsäure .....	67
4.2	BLUTPARAMETER VON PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN VOR DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	71
4.2.1	Vergleich der drei Gruppen .....	71
4.2.2	Lineare Beziehungen von Pyridoxal 5'-Phosphat.....	73
4.3	URIN- UND BLUTPARAMETER VON PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN NACH VITAMIN-B6-BELASTUNG.....	76
4.3.1	Vergleich der drei Gruppen .....	76
4.3.2	Lineare Beziehungen von Pyridoxal 5'-Phosphat und der 4-Pyridoxinsäure.....	78
4.3.3	Oxalat- und Glykolatausscheidung vor und nach der Belastung .....	82
4.3.4	Unterscheidung zwischen metabolischer Hyperoxalurie und nicht metabolischer Hyperoxalurie .....	84
4.4	DROP-OUT'S.....	85
4.5	UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN / NEBENWIRKUNGEN .....	86
5	DISKUSSION.....	86
4.3	PROTEINBELASTUNG VON NIERENSTEINPATIENTEN UND GESUNDEN FREIWILLIGEN.....	89
1	ZUSAMMENFASSUNG .....	89
2	EINLEITUNG .....	89
3	MATERIAL UND METHODEN.....	90
3.1	AUSWAHL DER PATIENTEN UND PROBANDEN .....	90
3.2	DURCHFÜHRUNG DER PROTEINBELASTUNG .....	91
3.3	BEURTEILUNGSPARAMETER.....	91
3.3.1	Probensammlung und -aufbereitung.....	91
3.3.2	Analysenmethoden.....	91

3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	91
4	ERGEBNISSE .....	92
5	DISKUSSION.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG, SCHLUSSFOLGERUNGEN UND PERSPEKTIVEN..	102
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	105
7	ANHANG .....	116
7.1	INFORMATIONSMAPPE PROTEINBELASTUNG .....	116
7.2	CURRICULUM VITAE .....	130

## II. LISTE DER ABKÜRZUNGEN

$\lambda_{EM}$	Emissionswellenlänge in nm
$\lambda_{EX}$	Exzitationswellenlänge in nm
24h-Urin	24-Stundenurin
4-PA	4-Pyridoxinsäure
Abk.	Abkürzung
Aqua ad Inj.	Aqua ad Injectabilia
BMI	Body-Mass-Index in $\text{kg/m}^2$
CAS-Nr.	Chemical Abstract Service Number = Chemical Abstract Registry Number
conc.	Konzentration
cv	Variationskoeffizient (engl. coefficient of variation)
EEC-Nr.	EINECS = European Inventory of Existing Chemical Substances
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Phosphorsäure
HO	Hyperoxalurie
HPD	Proteinreiche Kost (engl. high protein diet)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography) ältere Bezeichnung: Hochdruck-Flüssigchromatographie (engl. high pressure liquid chromatography)
ICSF	Idiopathischer Kalziumsteinpatient (engl. idiopathic calcium stone former)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
KG	Körpergewicht in kg
mean	Mittelwert
min. / max.	Minimum / Maximum
MMH	Milde metabolische Hyperoxalurie bzw. Patienten mit einer leichten metabolischen Hyperoxalurie (eng. mild metabolic hyperoxaluria)

Fortsetzung:

MPD	Ideale Kost mit einer mässigen Proteinzufuhr (engl. moderate protein diet)
MW	Molekulargewicht in g/mol (engl. molecular weight)
N	Anzahl
NaHSO <sub>3</sub>	Natriumbisulfit
noHO	Patienten ohne Hyperoxalurie (gem. Definition nie eine Hyperoxalurie in drei 24h-Urinsammlungen)
noMMH	Patienten mit Hyperoxalurie, aber ohne geringe metabolische Hyperoxalurie
P5'P	Pyridoxal 5'-Phosphat
PH. EUR.	Europäisches Arzneibuch
PTH	Parathormon (engl. parathyroid hormone)
PTH-rp	Parathyroid hormone related protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
sd	Standardabweichung (engl. standard deviation)
t <sub>R</sub>	Runzeit in Minuten
U-4PA	4-Pyridoxinsäure im Urin
v <sub>D</sub>	Geschwindigkeit der Postsäulen-Lösung in ml/h
v <sub>E</sub>	Geschwindigkeit des Elutionsmittels in ml/min
v <sub>I</sub>	Injektionsvolumen in µl
withHO	Patienten mit Hyperoxalurie (gem. Definition mindestens 2x eine Oxalurie > 450µmol/24h in drei 24h-Urinsammlungen)

### III. LISTE DER ABBILDUNGEN

ABBILDUNG 1: METABOLISCHE REAKTIONSWEGE ZUM OXALAT [KAELIN 2004]. SCHATTIERTE KREISE ENTSPRECHEN VERSCHIEDENEN ENZYMEN: AGT = ALANIN-GLYOXYLAT-AMINOTRANSFERASE, GR = GLYOXYLAT-REDUKTASE, GO = GLYKOLAT-OXIDASE, LDH = LACTAT-DEHYDROGENASE. EIN MANGEL AN AGT VERURSACHT EINE PRIMÄRE HYPEROXALURIE VOM TYP I, IN DER GLYOXYLAT NICHT IN GLYCIN UMGEWANDELT WERDEN KANN UND SO ZU EINER AKKUMULATION VON GLYKOLAT UND OXALAT FÜHRT. VITAMIN B6 KANN DIE METABOLISCHE STÖRUNG TEILWEISE ODER GAR VOLLSTÄNDIG KORRIGIEREN.....	6
ABBILDUNG 2: STRUKTURFORMELN VON PYRIDOXIN (I; R = -CH <sub>2</sub> OH), PYRIDOXAL (I; R = -CHO), PYRIDOXAMIN (I; R = -CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ), 4-PYRIDOXINSÄURE (III), 4-PYRIDOXOLACTON (IV), PYRIDOXIN 5'-PHOSPHAT (II; R = -CH <sub>2</sub> OH), PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT (II; R = -CHO) BZW. PYRIDOXAMIN 5'-PHOSPHAT (II; R = -CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ).....	15
ABBILDUNG 3: STRUKTURFORMEL VON PYRIDOXINHYDROCHLORID [EDI 1995] .....	16
ABBILDUNG 4: METABOLISCHE TRANSFORMATION VON VITAMIN B6 IN DER LEBER, MODIFIZIERT NACH [HOFF-JØRGENSEN1966, INK 1984, LUMENG 1984] .....	18
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHER AUFBAU DES HPLC-GERÄTES. 1: RESERVOIR DES ELUTIONSMITTELS, 2: HAUPTPUMPE, 3: PROBENEINLASSSYSTEM, 4: TRENNSÄULEN, 5: FLUORESZENZDETEKTOR, 6: SPRITZENPUMPE, 7: SIM-Box, 8: COMPUTER .....	37
ABBILDUNG 6: CHROMATOGRAMM DES P5'P IM SERUM .....	45
ABBILDUNG 7: CHROMATOGRAMM DER 4-PA IM 24H-URIN.....	46
ABBILDUNG 8: FLUORESZENZSPEKTRUM VON P5'P .....	47
ABBILDUNG 9: FLUORESZENZSPEKTRUM VON 4-PA.....	47
ABBILDUNG 10: AUSSCHIEDUNG VON OXALAT, GLYKOLAT UND KREATININ VON GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	65
ABBILDUNG 11: AUSSCHIEDUNG VON ZITRAT, SOWIE PH UND VOLUMEN DES 24H-URINS VON GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	66
ABBILDUNG 12: AUSSCHIEDUNG DER 4-PYRIDOXINSÄURE VON GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	67
ABBILDUNG 13: KORRELATION ZWISCHEN DER SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND DER AUSSCHIEDUNG AN 4-PYRIDOXINSÄURE BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXAL-URIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	69
ABBILDUNG 14: KORRELATION ZWISCHEN DER AUSSCHIEDUNG AN KREATININ UND DER 4-PYRIDOXINSÄURE BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	70

ABBILDUNG 15: KORRELATION ZWISCHEN DER AUSSCHIEDUNG AN HARNSTOFF UND DER 4-PYRIDOXINSÄURE BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	71
ABBILDUNG 16: SERUMKONZENTRATION VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT VON GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND VON NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXAL-URIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	73
ABBILDUNG 17: KORRELATIONEN ZWISCHEN DER SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND B-PHOSPHAT BZW. B-ALKALISCHEN PHOSPHATASE BEI NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	75
ABBILDUNG 18: AUSSCHIEDUNG DER 4-PYRIDOXINSÄURE SOWIE SERUMKONZENTRATION VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT VON DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND VON DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	78
ABBILDUNG 19: KORRELATION ZWISCHEN DEM U-OXALAT/U-KREATININ-QUOTIENTEN UND DER SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	80
ABBILDUNG 20: KORRELATION ZWISCHEN DEM U-OXALAT/U-KREATININ- UND DEM U-4-PYRIDOXINSÄURE/U-KREATININ-QUOTIENTEN BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	81
ABBILDUNG 21: INDIVIDUELLER WECHSEL DER OXALAT- UND GLYKOLATAUSSCHIEDUNG BEI DEN PROBANDEN (CONTROLS) UND DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPER-OXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER DER VITAMIN-B6-BELASTUNG .....	83
ABBILDUNG 22: SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT SOWIE DELTA PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT VON NIERENSTEINPATIENTEN MIT EINER GERINGEN METABOLISCHEN HYPEROXALURIE (MMH) UND VON NIERENSTEINPATIENTEN MIT EINER 'GEWÖHNLICHEN' HYPEROXALURIE (NO MMH) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG ....	85
ABBILDUNG 23: INDIVIDUELLE ÄNDERUNG DER OXALATAUSSCHIEDUNG DER GESUNDEN PROBANDEN UND DER NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE GERINGE METABOLISCHE HYPEROXALURIE (MMH BZW. NOHO) UNTER DER IDEALEN KOST (MPD) VERGlichen MIT DER PROTEINREICHEN KOST (HPD) .....	95
ABBILDUNG 24: SERUMKONZENTRATION VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND AUSSCHIEDUNG DER 4-PYRIDOXINSÄURE UNTER DER PROTEINREICHEN KOST. DIE NICHT AUSGEFÜLLTEN KREISE (O) ENTSPRECHEN DEN PATIENTEN MIT EINEM SIGNIFIKANTEN ANSTIEGEN DER OXALATAUSSCHIEDUNG. DIE BEIDEN HORIZONTALEN LINIEN ENTSPRECHEN DEM 2.5% QUANTIL DES REFERENZBEREICHES. ....	97
ABBILDUNG 25: KORRELATIONEN ZWISCHEN DER SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND DER AUSSCHIEDUNG AN 4-PYRIDOXINSÄURE BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN (CONTROLS) UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN (ICSF). DIE NICHT AUSGEFÜLLTEN KREISE (O) ENTSPRECHEN DEN PATIENTEN OHNE HYPEROXALURIE. KREISE MIT EINEM BALKEN (Ø) ENTSPRECHEN PATIENTEN MIT EINEM SIGNIFIKANTEN ANSTIEGEN DER OXALATAUSSCHIEDUNG .....	98

ABBILDUNG 26: KORRELATIONEN ZWISCHEN DER OXALATAUSSCHIEDUNG UND DER  
SERUMKONZENTRATION AN PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN  
UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN UNTER DER PROTEINREICHEN KOST. DIE NICHT  
AUSGEFÜLLTEN KREISE (O) ENTSPRECHEN DEN PATIENTEN OHNE HYPEROXALURIE.  
KREISE MIT EINEM BALKEN (Ø) ENTSPRECHEN PATIENTEN MIT EINEM SIGNIFIKANTEN  
ANSTIEGEN DER OXALATAUSSCHIEDUNG..... 99

## IV. LISTE DER TABELLEN

TABELLE 1: AKUTE TOXIZITÄT (LD <sub>50</sub> ) PYRIDOXINHYDROCHLORID [DAUNDERER 1981] .....	21
TABELLE 2: AKUTE TOXIZITÄT (LD <sub>50</sub> ) PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT.....	22
TABELLE 3: SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT (LD <sub>50</sub> ) PYRIDOXINHYDROCHLORID.....	22
TABELLE 4: REAGENTIEN UND CHEMIKALIEN.....	38
TABELLE 5: HERSTELLUNG VON P5'P-STANDARDS .....	41
TABELLE 6: HERSTELLUNG VON 4-PA-STANDARDS.....	42
TABELLE 7: INTRA-ASSAY VARIANZ.....	48
TABELLE 8: INTER-ASSAY VARIANZ.....	48
TABELLE 9: RECOVERY VON P5'P .....	49
TABELLE 10: RECOVERY VON 4-PA.....	49
TABELLE 11: CHARAKTERISTIK UND URINPARAMETER VON GESUNDEN PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT .....	63
TABELLE 12: KORRELATIONEN DER 4-PYRIDOXINSÄURE MIT DEN BESTIMMTEN PARAMETERN. AUFGEFÜHRT SIND DIE KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN R UND DIE SIGNIFIKANZ P* .....	68
TABELLE 13: CHARAKTERISTIK UND BLUTPARAMETER VON GESUNDEN PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXAL-URIE (WITHHO BZW. NOHO) UNTER FREIER DIÄT* .....	72
TABELLE 14: KORRELATIONEN VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT MIT DEN BESTIMMTEN PARAMETERN. AUFGEFÜHRT SIND DIE KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN R UND DIE SIGNIFIKANZ P* .....	74
TABELLE 15: CHARAKTERISTIK, BLUT- UND URINPARAMETER VON GESUNDEN PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG* .....	77
TABELLE 16: KORRELATIONEN VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT UND DER 4-PYRIDOXINSÄURE MIT DEN BESTIMMTEN PARAMETERN. AUFGEFÜHRT SIND DIE KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN R UND DIE SIGNIFIKANZ P VON GESUNDEN PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE HYPEROXALURIE (WITHHO BZW. NOHO) NACH DER VITAMIN-B6-BELASTUNG* .....	79
TABELLE 17: BLUT- UND URINPARAMETER VON NIERENSTEINPATIENTEN MIT EINER GERING- EN METABOLISCHEN HYPEROXALURIE UND VON NIERENSTEINPATIENTEN MIT EINER 'GEWÖHNLICHEN' HYPEROXALURIE (MMH BZW. NOMMH) NACH DER VITAMIN-B6- BELASTUNG* .....	84
TABELLE 19: CHARAKTERISTIK DER GESUNDEN PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE GERINGE METABOLISCHE HYPEROXALURIE (MMH BZW. NOHO)* .....	92
TABELLE 20: ZUSAMMENSETZUNG DER BEIDEN DIÄTEN, IDEALE KOST (MPD) UND	



PROTEINREICHE KOST (HPD), DER GESUNDEN PROBANDEN UND DER NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE GERINGE METABOLISCHE HYPEROXALURIE (MMH BZW. NOHO)* .....	94
TABELLE 21: ÄNDERUNGEN VON WEITEREN URINPARAMETERN BEIM WECHSEL VON DER IDEALEN KOST (MPD) ZUR PROTEINREICHEN KOST (HPD) BEI DEN GESUNDEN PROBANDEN UND BEI DEN NIERENSTEINPATIENTEN MIT ODER OHNE GERINGE METABOLISCHE HYPEROXALURIE (MMH BZW. NOHO)* .....	96

# 1 EINLEITUNG

Nephrolithiasis ist eine allgemein bekannte Ursache von Morbidität in den Industrienationen. Die Steinfrequenz ist variabel und wechselhaft und reicht von nur einem oder zwei Ereignissen im Leben auf bis zu 20 und mehr Ereignissen pro Jahr, manchmal auch unterbrochen von einer längeren Periode ohne Rezidiv [Editorial 1976]. Die meisten Steine (80-90%) bestehen aus Kalziumsalzen [Pak 1993], v.a. Kalziumoxalat-Monohydrat (Whewellit), Kalziumoxalat-Dihydrat (Weddellit) und weniger häufig Kalziumphosphat [Stein 1995].

Das idiopathische Steinleiden ist charakterisiert durch eine rezidivierende Bildung von Kalziumoxalat-, Kalziumphosphat- und Hydroxyapatit-Steinen und das ohne offensichtlich unterliegenden Grund [Erwin 1976]. Annähernd 50% der Patienten mit einem idiopathischen Steinleiden haben eine Hyperkalziurie. Eine Kalziumsteinbildung kann sich aber auch aufgrund einer Hypozitraturie, Hyperoxalurie und/oder einer Hyperurikosurie bilden [Jaeger 1992, Pak 1993]. Die meisten Patienten mit einer Hyperoxalurie haben ein diätetisches Problem. Eine geringe bis mässige Hyperoxalurie (44-60mg/24h resp. 489-667µmol/24h) kann aufgrund der Konsumation von oxalatreichen Nahrungsmitteln wie z.B. Spinat, Nüsse, Schokolade und Tee entstehen [Pak 1993]. Zusätzlich tritt eine Hyperoxalurie auf (1.) bei der primären Hyperoxalurie; (2.) bei Pyridoxinmangel; (3.) selten bei einer exzessiven Einnahme von Vitamin C und (4.) bei einer erhöhten Absorption von Oxalat, was als enterale Hyperoxalurie bezeichnet wird [Goldenberg 1996].

Trotzdem, 70-95% der täglichen Oxalatausscheidung hat einen metabolischen Ursprung, d.h. Oxalat entsteht indirekt via Glyoxylat (aus Glykolat oder Hydroxyprolin gebildet) oder direkt aus Tryptophan (z.B. aus Fleischprotein) [Jaeger 1992]. Um eine exzessive Oxalatproduktion aus Glyoxylat zu verhindern, wird das letztere enzymatisch in Glycin transaminiert. Für diese enzymatische Reaktion benötigt das Apoenzym allerdings Vitamin B6 [Jaeger 1992], welches als Kofaktor dient [Latta 1990, Milliner 1994, Sutton 1994] und somit die Oxalatproduktion durch Enzyminduktion reduzieren kann [Milliner 1994]. Ferner ist gesichert, dass ein ernährungsbedingter Vitamin-B6-Mangel zu einem markanten Ansteigen der Urinoxalatausscheidung bei Ratten [Yachiku 1969, Gershoff 1970, Sutton 1994] und somit zur Produktion von Nierensteinen führt [Gershoff 1970]. Eine klinische Studie, durchgeführt mit 169 Nierensteinpatienten, deckte einen Mangel an Vitamin B6 aufgrund einer reduzierten 4-Pyridoxinsäure auf [Izashvili 1973], des Hauptausscheidungsprodukts von Vitamin B6 im Urin [Dauserer 1981]. Der inhibitorische Effekt von Pyridoxin und Magnesium auf die Entwicklung der Kalziumoxalat-Urolithiasis ist in mehreren Studien am Tier [Schneider 1977, Kridl 1984], aber auch am Menschen [Gershoff 1967, Rattan 1994] bestätigt worden. Pyridoxin wurde erfolgreich zur Reduktion der Oxalatausscheidung bei zahlreichen Patienten mit rezidivierenden Nierensteinen angewendet [Revusova 1978, Revusova 1982, Murthy 1982, Balcke 1983, Jaeger 1986, Mitwalli 1988]. Zusätzlich bewirkt Pyridoxin auch

bei einigen Patienten mit einer primären Hyperoxalurie, einer seltenen genetischen Störung, eine Verminderung der Hyperoxalurie [Gibbs 1970, Will 1979a, Will 1979b, Alinei 1984, Yendt 1985, Amato 1987].

Es ist allgemein bekannt, dass verschiedene Ernährungsfaktoren ein signifikantes Risiko zur Steinbildung darstellen, wie z.B. eine ungenügende Flüssigkeitszufuhr und/oder eine exzessive Einnahme an oxalatreichen Nahrungsmitteln, Kalzium, Natrium oder tierischen Eiweissen [Pak 1984]. Daten aus dem 2. Weltkrieg zeigen, dass, wenn ein Land aufgrund von Entbehrungen weniger Proteine konsumiert, die Frequenz von Nierensteinen sinkt, und wenn ein Land mehr Proteine in der Nahrung zu sich nimmt, die Frequenz ansteigt [Hall 1995]. Eine exzessive Einnahme tierischer Proteine (z.B. Fleisch, Geflügel, Fisch) kann die Kalzium- und Harnsäureausscheidung erhöhen sowie den Urin-pH und die Zitratausscheidung erniedrigen [Pak 1984]. Aus dem folgt ein erhöhtes Risiko für eine idiopathische Kalzium-Urolithiasis. Vitamin B6, in Form des Koenzyms Pyridoxal 5'-Phosphat, ist in viele wichtige metabolische Prozesse involviert, darin eingeschlossen Transaminierung und Decarboxylierung im Proteinmetabolismus [Hudson 1989]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Vitamin-B6-Bedarf positiv korreliert ist mit dem Proteingehalt in der Diät sowohl beim Tier [Bai 1991, Okada 1998] als auch beim Menschen [Editorial 1987].

Aufgrund der Rolle, die Vitamin B6 im Oxalatmetabolismus zukommt und bedingt auch durch den erwiesenen therapeutischen Erfolg, wurde die Hypothese aufgestellt, dass gewisse idiopathische Steinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie einen Mangel, eine gestörte Absorption und/oder einen gestörten Metabolismus an Vitamin B6 haben könnten, welcher sie in Bezug auf Oxalat hypersensibel auf tierische Proteine in der Nahrung macht.

Schon allein die enormen Sozialausgaben durch wiederholte Steinbehandlung gebieten auch den Ursachen des Steinleidens nachzugehen und, wenn möglich, diese zu behandeln [Hautmann 1992]. Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Schritt in diese Richtung getan werden, und das aufgrund der bis heute durchgeführten Untersuchungen mit Pyridoxin in vitro und in vivo, den daraus gewonnenen Erkenntnissen und auch den gemachten Erfahrungen mit dem Medikament Benadon®.

## 2 DAS NIERENSTEINLEIDEN - EIN ÜBERBLICK

### 1 EINLEITUNG

Das Harnsteinleiden ist keine Erkrankung unserer Zeit, sondern begleitet die Menschheit wahrscheinlich seit ihrem Beginn [Schneider 1994]. In Skeletten wurden Blasensteine gefunden, deren Alter über 7000 Jahre betragen soll [Hess 1999]. Wie Funde aus früheren Zeiten zeigen, hat sich auch die Zusammensetzung der Konkremeinte kaum geändert [Schneider 1994].

Der Blasensteinschnitt wurde erstmals um 500 v.Chr. in der altindischen Agur Veda von Susruta dargestellt und erlangte eine Perfektion in dem Buch von Aulus Cornelius Celsus (30 n.Chr.) "De Re Medicina". Mit Jean Civiale (1824) begann das Zeitalter der transurethralen Lithotripsie, die durch die Erfindung des Blasenspiegels vervollkommen wurde. Zystolithotripsie, Schlingenbehandlung von Uretersteinen und die vielfältigsten Arten der Nierensteinoperationen beherrschten das Bild, bis es durch perkutane Nephrolitholapaxie, Ureterorenoskopie [Kanig 1985, Schneider 1994] und vor allem durch die extrakorporale Stosswellenlithotripsie zu einem grundlegenden Wandel in der Behandlung des Steinleidens kam. Aber auch diese modernen Behandlungsmethoden beeinflussen nur das Endprodukt der Steinerkrankung, das Konkrement, nicht die Ursachen seiner Bildung [Schneider 1994].

Vordringlichste Aufgabe bleibt weiterhin die Verhinderung der Steinbildung überhaupt (Prophylaxe) oder zumindest der wiederholten Steinbildung (Metaphylaxe).

### 2 DAS NIERENSTEINLEIDEN IM ENGEREN SINNE

#### 2.1 HÄUFIGKEIT

Inzidenz und Prävalenz des Steinleidens werden durch Ernährungsgewohnheiten sowie genetische Faktoren und Umweltbedingungen bestimmt [Hess 1999]. So sind z.B. Nierensteine in den sonnenreichen, heißen Regionen im Süden der USA oder in Saudi-Arabien deutlich gehäuft.

Die jährliche Inzidenz des Nierensteinleidens in den USA und Europa beträgt 0.1-0.4%, d.h. 100-400 neue Steinpatienten pro 100'000 Einwohner [Kanig 1985, Pak 1993, Hess 1999]. Die Prävalenzen über die gesamte Lebensdauer betragen in Asien rund 5%, in Europa 8-15% [Hess 1999], in den USA 5-10% [Pak 1993] und in Saudi-Arabien gar 20% [Hess 1999]. Ferner ist das Nierensteinleiden in Weißen mindestens zweimal so häufig wie in Schwarzen [Boyce 1956, Hiatt 1982] und tritt meistens zwischen der 4. und 6. Altersdekade auf [Johnson 1979, Hiatt 1982].

#### 2.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Die Entstehung von Harnsteinen ist ein vielschichtiger Vorgang, der in unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft und bei dem Faktoren der Übersättigung,

Lösungsvermittlung, Keimbildung, Kristallisation, Aggregation, des Wachstums, Umbaus und der Auflösung gleichzeitig und nacheinander vorkommen [Schneider 1994].

### **2.2.1 Formale Genese**

Da Harnsteine aus Kristallen und einem organischen Gerüst (Matrix) bestehen, existiert seit vielen Jahren eine Matrix- und eine Kristallisationstheorie der Steinentwicklung [Schneider 1994].

#### **2.2.1.1 Matrixtheorie**

Organische nichtkristalline Substanzen mit einem Anteil von 2-10% durchziehen den Stein wie ein Gerüst [Schneider 1994]. Möglicherweise wird die organische Substanz von der Niere unter pathologischen Bedingungen ausgeschieden, und die Harnsalze lagern sich sekundär ab.

Nach dieser Theorie hätte die Matrix eine steuernde Funktion für den Steinaufbau. Das entspricht einer heterogenen Keimbildung einerseits, und andererseits hätte die organische Substanz eine Zementfunktion bei der Kristallaggregation.

#### **2.2.1.2 Kristallisationstheorie**

Hier wird die Steinbildung als Kristallisation von Harnsalzen in einer übersättigten Lösung verstanden [Kanig 1985, Schneider 1994]. Dabei werden vier allgemeine Phänomene wirksam: Übersättigung, Nukleation, kristallines Wachstum und Aggregation von Kristallen [Schneider 1994].

### **2.2.2 Kausale Genese**

Harnsteinkranke unterscheiden sich von Gesunden entweder durch einen mit steinbildenden Substanzen stärker übersättigten Urin (Kalzium, Oxalsäure, Harnsäure, Cystin), einen Mangel an Inhibitoren, eine gestörte Harnstromdynamik, durch Ausscheidung grosser und vieler Kristalle oder durch eine Kombination solcher Faktoren [Schneider 1994].

## **2.3 KONKREMENTANALYSE UND ZUSAMMENSETZUNG**

Die chemische Zusammensetzung eines Konkrements erlaubt Rückschlüsse auf die Ursache und damit auf die Therapie [Hess 1995]. Demzufolge steht die Konkrementanalyse in der Alltagspraxis vor jeglichen Blut- und urinchemischen Labortests. Die Steinanalyse sollte auch nur von Laboratorien vorgenommen werden, welche entweder über die Möglichkeit der Infrarotspektroskopie oder der Röntgendiffraktion verfügen. Diese Verfahren sind von gleich hochstehender Qualität und gelten heute als Standardmethoden.

Bisher sind rund 50 verschiedene chemische Zusammensetzungen des kristallinen Anteils von Nierensteinen beschrieben worden, worunter zahlreiche ausgesprochene Raritäten [Hess 1999].

Nebst einem kleinen Anteil an organischer Matrix enthalten Steine zu 95-98% kristallines Material [Hess 1995]. Letzteres besteht in rund 80-90% aller Fälle aus Kalziumsalzen [Pak 1993, Hess 1995, Stein 1995]. Von diesen sind 50-

75% Kalziumoxalat, seltener sind gemischte Steine aus Kalziumoxalat und -phosphat oder reine Kalziumphosphatsteine [Hess 1995]. Harnsäuresteine sind je nach Autor in einer Häufigkeit von 5-20% aller Nierensteine nachweisbar [Pak 1993, Stein 1995].

Chemische Zusammensetzung, Struktur, Bildungsbedingungen und Lokalisation bestimmen das Aussehen der Steine [Schneider 1994]. Sie können deshalb die bizarrsten Formen annehmen und im Falle von sogenannten Ausgusssteinen auch eine erhebliche Grösse von mehreren cm Durchmesser aufweisen [Hess 1999].

## **2.4 RISIKOFAKTOREN**

Risikofaktoren einer vermehrten Kristallisation von Kalziumsalzen im Urin sind ein geringes Urinvolumen, eine Hyperoxalurie, Hyperkalziurie, Hyperurikosurie, Hypozitraturie [Hess 1995, Goldfarb 1999], eine inkomplette renal-tubuläre Azidose und/oder ein tiefer Urin-pH [Hess 1995].

### **2.4.1 Tiefes Urinvolumen**

Ein chronisch tiefes Harnvolumen ist nach wie vor der wohl wichtigste Risikofaktor der Nierensteinbildung; bei abnehmenden Harnmengen unter 1200ml/24h steigt die Übersättigung und somit das Risiko der Steinbildung im Urin exponentiell an [Hess 1995].

### **2.4.2 Hyperoxalurie**

Die Oxalatausscheidung im Urin ist eine wichtige Determinante der Kalziumoxalat-Nierensteinbildung [Curhan 1999]. Der Referenzwert an Oxalat im Urin beträgt für die gesunde Bevölkerung  $< 440\mu\text{mol}/24\text{h}$  [Hess 1999]. Nach Mahlzeiten wird eine erhöhte Ausscheidung beobachtet, wobei die Variation von Stunde zu Stunde bei den Steinpatienten im Vergleich mit Gesunden am meisten ausgeprägt ist [Tiselius 1977b].

#### **2.4.2.1 Intestinale Absorption von Oxalat**

Im flüssigen Darminhalt kommt es genau wie im Urin zur Auskristallisation des schwerlöslichen Kalziumoxalats [Hess 1995]. Nur etwa 10-15% des mit der Nahrung aufgenommenen Oxalats liegen in gelöster Form im Darmlumen vor und werden absorbiert, wobei die Oxalatabsorption aus dem Darm ein passives Diffusionsphänomen sowohl beim Menschen als auch im Tierexperiment ist [Nath 1990]. Ein relativer Kalziummangel im Darmlumen bewirkt, dass mehr gelöstes Oxalat zur Verfügung steht und absorbiert wird [Hess 1995]. So führt die bei Patienten mit Kalziumnephrolithiasis leider immer noch empfohlene kalziumarme Diät regelmässig zur vermehrten Absorption von Oxalat und somit zu einem Anstieg der Oxalatausscheidung im Urin. Da eine gleichzeitig oxalatarme Diät nur schwer durchführbar ist, resultiert eine Hyperoxalurie.

#### **2.4.2.2 Oxalatmetabolismus**

Nur etwa 15% des normalerweise ausgeschiedenen Oxalats gelangen via Absorption im Darm in den Urin [Smith 1992, Hess 1995], während der Hauptan-

teil aus dem körpereigenen Metabolismus stammt [Hess 1995]. Wie Abbildung 1 zeigt, spielt allerdings auch hierbei die Ernährung eine nicht unwesentliche Rolle: Ein überhöhter Konsum an tierischen Eiweißen kann direkt via Tryptophan (Fleischprotein) oder indirekt via Hydroxyprolin (Kollagen aus Fleisch) und Glyoxylat zu einer vermehrten Oxalatausscheidung führen.

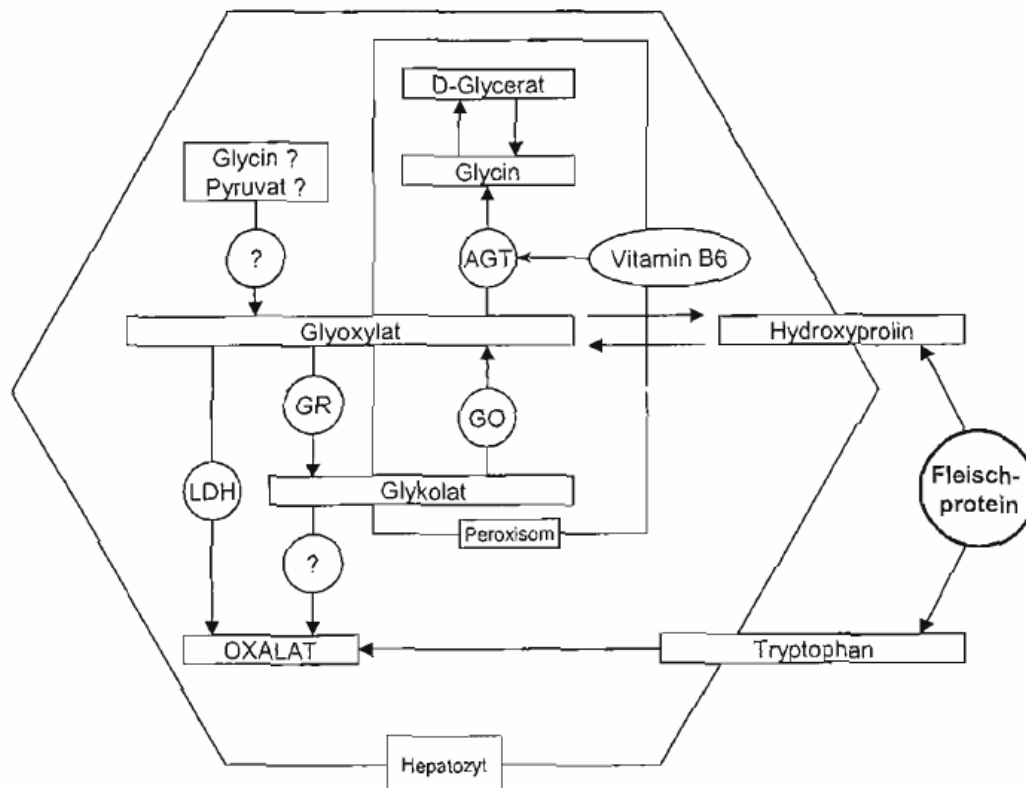


Abbildung 1: Metabolische Reaktionswege zum Oxalat [Kaelin 2004]. Schattierte Kreise entsprechen verschiedenen Enzymen: AGT = Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase, GR = Glyoxylat-Reduktase, GO = Glykolat-Oxidase, LDH = Lactat-Dehydrogenase. Ein Mangel an AGT verursacht eine primäre Hyperoxalurie vom Typ I, in der Glyoxylat nicht in Glycin umgewandelt werden kann und so zu einer Akkumulation von Glykolat und Oxalat führt. Vitamin B6 kann die metabolische Störung teilweise oder gar vollständig korrigieren

### 2.4.2.3 Hyperoxalurie

#### 2.4.2.3.1 Enterale Hyperoxalurie

Derselbe Mechanismus der intestinal vermehrten Oxalataufnahme kommt bei jeglicher Form von chronischer Darmerkrankung mit Malabsorption vor: Das zugeführte Kalzium bildet mit nicht absorbierten Fetten Kalkseifen, so dass weniger freies Kalzium zur Ausfällung von Oxalat zur Verfügung steht [Hess 1995]. Dies führt vorwiegend distal im Darm zu stark vermehrter Oxalatabsorption und schliesslich zur enteralen Hyperoxalurie.

In seltenen Fällen begünstigt der gleiche Mechanismus bei exzessiver Zufuhr oxalathaltiger Getränke und Nahrungsmittel auch bei normaler Kalziumzufuhr wegen relativem Kalziummangel im Darmlumen das Auftreten einer Hyperoxalurie.

#### 2.4.2.3.2 Metabolische Hyperoxalurie

Bei leichter Hyperoxalurie (Oxalatausscheidung bis etwa 800µmol/24h) mit erhöhter Glykolatausscheidung (Glykolat > Oxalat) spricht man von einer leichten metabolischen Hyperoxalurie, als deren häufigste Ursache man einen exzessiven Konsum an tierischem Eiweiss findet [Hess 1995].

#### 2.4.2.3.3 Primäre Hyperoxalurie

Die primäre Hyperoxalurie vom Typ I ist eine autosomal-rezessiv vererbte Störung des Glyoxylat-Metabolismus [Frosch 1989], der ein Defekt der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) in Peroxisomen der Leber zugrunde liegt [Frosch 1989, Jones 2000, Nolkemper 2000]. Der häufigere Typ I der Hyperoxalurie ist neben erhöhten Urin- und Plasmakonzentrationen für Oxalat biochemisch gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Konzentration für Glykolat in Urin und Plasma [Frosch 1989].

Die viel seltenere primäre Hyperoxalurie vom Typ II ist durch das Fehlen des Enzyms D-Glycerat-Dehydrogenase/Glyoxylat-Reduktase charakterisiert [Kemper 1997], das die Reduktion von Hydroxypyruvat zu D-Glycerat, die Reduktion von Glyoxylat zu Glykolat und die Oxidation von D-Glycerat zu Hydroxypyruvat katalysiert [Cramer 1999]. Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Ausscheidung an Oxalat und L-Glycerat im Urin [Frosch 1989, Kemper 1997, Cramer 1999].

### 2.4.3 Hyperkalziurie

Bei Hyperkalziurie sollen zunächst immer klar definierte Ursachen gesucht und ausgeschlossen werden, wie primärer Hyperparathyreoidismus, Sarkoidose, exzessive Vitamin-D-Zufuhr, Malignom, langdauernde Immobilisation, Markschwammniere und distale renal-tubuläre Azidose [Hess 1995].

Die Mehrheit der in Frage kommenden Ursachen geht zumeist mit einer Hyperkalzämie einher, was eine Bestimmung des Kalziums im Blut nötig macht. Bestätigt sich die Hyperkalzämie, sollte das Parathormon bestimmt werden. Ein primärer Hyperparathyreoidismus als Ursache für eine Hyperkalziurie wird bei 5-6% aller Patienten mit Kalziumnephrolithiasis gefunden [Kanig 1985, Hess 1995]. Werden hingegen bei Hyperkalzämie tief- oder subnormale Parathormonwerte (PTH) gemessen, müssen andere Ursachen, wie z.B. erhöhtes 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> (z.B. Sarkoidose) oder vermehrt produziertes PTH related protein (PTH-rp) im Rahmen eines Malignoms gesucht werden [Hess 1995]. Ist die Kalzämie normal und sind Markschwammniere und renal-tubuläre Azidose ausgeschlossen, liegt eine sogenannte idiopathische Hyperkalziurie vor. Sie kommt bei über 50% aller Patienten mit Kalziumnephrolithiasis [Kanig 1985, Hess 1995], aber auch bei etwa 5-10% der Nierengesunden vor [Hess 1995]. Bei diesem Syndrom besteht generell im Körper ein be-



schleunigter Kalziumtransport, welcher nicht nur die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm, sondern auch den Aufbau und vor allem die Resorption von Knochen ebenso wie die Ausscheidung von Kalzium durch die Nieren betrifft. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass starke Sonnenbestrahlung auch zu einer Hyperkalziurie führen kann [Parry 1975]. Während der Sonnenlichtexposition photolysieren ultraviolette B-Photonen (290-315nm) 7-Dehydrocholesterol zu Prävitamin D3, welches durch Isomerisation in Vitamin D3 umgewandelt wird [Holick 1995]. Vitamin D3 ist biologisch inert und wird in der Leber und in der Niere in das biologisch aktive Hormon 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 transformiert, welches den Blutkalziumspiegel reguliert. Der Referenzwert der Kalziurie beträgt bei Männern  $< 9.00\text{mmol}/24\text{h}$  und bei Frauen  $< 8.00\text{mmol}/24\text{h}$  [Hess 1999].

#### **2.4.4 Hyperurikosurie**

Der Harnsäurebestand des Organismus wird durch den Puringehalt der Nahrung, die endogene Synthese und die renale Harnsäureexkretion bestimmt [Stein 1995]. Der Referenzwert der Urikosurie beträgt in Männern  $< 5000\mu\text{mol}/24\text{h}$  und in Frauen  $< 4000\mu\text{mol}/24\text{h}$  [Hess 1999].

#### **2.4.5 Hypozitraturie / Inkomplette renal-tubuläre Azidose**

Die negativ geladenen Zitrationen bilden im Urin mit Kalzium lösliche Komplexe, wodurch die Konzentration des freien ionisierten Kalziums gesenkt und die Übersättigung bezüglich Kalziumoxalat effizient reduziert wird [Hess 1995]. Eine Hypozitraturie wird je nach Studie in 19-63% aller Nierensteinpatienten gefunden.

Der Zitratstoffwechsel ist eng mit dem Säure-Basen-Haushalt verknüpft. Das glomerulär frei filtrierte Ziträt wird zum Teil durch die proximalen Tubuluszellen aufgenommen und verstoffwechselt. Bei Azidose wird die Aufnahme durch die proximale Tubuluszelle gesteigert, bei Alkalose vermindert. Entscheidend scheint dabei nicht der systemische Säure-Basen-Status, sondern vielmehr jener innerhalb der proximalen Tubuluszelle: Eine vermehrte intrazelluläre Ansäuerung führt zu verminderter, eine vermehrte Alkalinisierung zu vermehrter Zitrat Ausscheidung im Urin. Daraus lässt sich ableiten, dass die Menge des im Urin ausgeschiedenen Zitrats wiederum stark von der Ernährung abhängt.

Auch permanenter Bikarbonatverlust im Rahmen einer chronischen Darmerkrankung mit Diarrhoe führt regelmässig zum Abfall der Zitrat Ausscheidung. Andererseits reduziert eine extrem eiweissreiche und somit säurelastige Kost die Zitrat Ausscheidung schon bei Nierengesunden, allerdings innerhalb des Normbereichs.

In bis zu 90% der Nierensteinpatienten mit zu tiefer Urinzitrat Ausscheidung findet sich diese Störung in Form einer inkompletten renal-tubulären Azidose, einer verminderten Kapazität der Niere, sauren Urin zu produzieren und dadurch überschüssige saure Valenzen auszuscheiden. Der Referenzwert der Zitrat urie beträgt in Männern  $> 1.70\text{mmol}/24\text{h}$  und in Frauen  $> 1.90\text{mmol}/24\text{h}$  [Hess 1999].

## **2.5 WEITERE BEEINFLUSSENDE FAKTOREN**

### **2.5.1 Diät / Proteinzufuhr**

Während es zur Zeit der beiden Weltkriege wenig Patienten mit Nierensteinleiden gab [Prien 1971, Hall 1995, Hess 1999], kam es z.B. in Japan in den letzten zwei Jahrzehnten mit der zunehmenden Amerikanisierung der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl von Patienten mit Kalziumsteinen [Hess 1999].

Epidemiologisch besteht zwar ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Überkonsum von tierischem Eiweiss und dem gehäuften Auftreten von Nierensteinen [Hess 1995]. Würde ein solches Diätverhalten unweigerlich zu Steinbildung führen, wäre das Kalziumnierensteinleiden extrem häufig, was jedoch nicht der Fall ist.

### **2.5.2 Tamm-Horsfall-Glycoprotein (THP)**

Das Tamm-Horsfall-Glycoprotein ist das quantitativ bedeutendste Protein im Urin Nierengesunder; seine tägliche Ausscheidung beträgt rund 40mg [Hess 1995]. Patienten mit Kalziumnephrolithiasis scheiden in der Regel gleich viel THP aus wie die Gesunden, hingegen finden sich Hinweise, dass zwischen THP-Molekülen von Patienten mit schwer rezidivierender idiopathischer Kalziumoxalatnephrolithiasis und Nierengesunden qualitative Unterschiede bestehen. Aktive Kalziumsteinbildner scheiden strukturell abnorme THP-Moleküle aus, welche bei urinphysiologisch hohen Konzentrationen von Kalzium-, Natrium- und H-Ionen eine abnorm starke Tendenz zur Bildung hochvisköser Polyaggregate zeigen. Dieser strukturellen Abnormalität liegt höchstwahrscheinlich ein verminderter Sialinsäuregehalt der THP-Moleküle zugrunde. Solchermassen defekte THP-Moleküle zeigen eine deutlich verminderte Hemmung der Aggregation von Kalziumoxalatkristallen in vitro. Bei urinphysiologischer mittlerer Konzentration von Kalzium wird THP von Patienten mit stark rezidivierendem Kalziumsteinleiden gar zum Promotor der Kristallaggregation, während normales THP immer noch leicht hemmend wirkt.

### **2.5.3 Magnesium**

Magnesium ist ein Inhibitor der Kalziumoxalatkristallisation, indem es die Löslichkeit des Kalziumoxalats erhöht [Gulati 1988].

### **2.5.4 Glykolat**

Glykolat, in grosser Menge dem Rattenfutter beigegeben, führt, wenn es zusammen mit der Diät an Ratten verfüttert wird, zu einer Hyperoxalurie und Kalziumoxalatkristallablagerung in der Niere [Gulati 1988]. Eine erhöhte Ausscheidung an Glykolat im Urin von Patienten mit Kalziumoxalatsteinen wurde zudem als Indikator für eine erhöhte endogene Produktion von Oxalat verwendet [Smith 1992].

### **2.5.5 Vitamin C**

Der Einfluss von Vitamin C auf die Oxalurie wird in der Literatur kontrovers beurteilt. Verschiedene Studien zeigten, dass rezidivierende Nierensteinpatienten

eine signifikant erhöhte Ausscheidung an Oxalat und eine erniedrigte Ascorbatexkretion haben [Chalmers 1986]. Ferner kam es in Kalziumsteinpatienten, verglichen mit gesunden Probanden, unter oraler und intravenöser Verabreichung von Ascorbat zu einer verstärkten Produktion von Oxalat aus Ascorbat. Die Oxalatausscheidung im Urin korreliert mit der Vitamin-C-Zufuhr [Tiselius 1977b, Trinchieri 1991]. Obwohl ein Teil des Oxalates von metabolisierter Ascorbinsäure abstammt [Gerster 1997, Curhan 1999], erhöhen hohe Dosen an Vitamin C, bedingt durch einen physiologischen Regulierungsfaktor, das Risiko eines Kalziumoxalatnierensteins nicht: Die gastrointestinale Absorption wie auch die renal-tubuläre Reabsorption der Ascorbinsäure sind sättigbare Prozesse und die metabolische Transformation von Ascorbinsäure zu Oxalat ist ebenfalls limitiert [Gerster 1997].

In einer Studie wollten die Autoren herauszufinden, ob in Frauen zwischen der Einnahme von Vitamin C und dem Risiko einer Nierensteinbildung ein Zusammenhang besteht [Curhan 1999]. Die Studie wurde mit einer Kohorte von 85'557 Frauen durchgeführt, die bis anhin keine Nierensteine hatten. Es wurden semiquantitative Fragebögen zur Erfassung des Vitaminkonsums in der Nahrung als auch in Supplementen verwendet. Während der 14jährigen Follow-up-Periode wurden 1078 Fälle von Nierensteinen dokumentiert. Es zeigte sich, dass die Vitamin-C-Aufnahme nicht mit dem Risiko einer Nierensteinbildung assoziiert war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Vitamin C dann zu einem Risikofaktor wird, wenn es in hohen Dosen konsumiert wird. Ein normaler oder auch ein leicht erhöhter Vitamin-C-Konsum hingegen führt bei normaler Nierenfunktion nicht zu Problemen. In diesem Sinne ist eine Vitamin-C-Einschränkung ungerechtfertigt. Die Zufuhr von hohen Dosen, insbesondere bei Nierensteinpatienten, sollte jedoch vermieden werden.

## **2.6 EINSCHÄTZUNG DES STEINBILDUNGSRISIKOS**

### **2.6.1 Das molare Produkt von Kalzium x Oxalat**

Das molare Produkt von Kalzium x Oxalat ist ein wichtiges Mass für die Berechnung des Risikos einer Kalziumoxalatpräzipitation und einer Steinbildung [Murthy 1982, Rattan 1994]. Ein Rückgang dieses Produkts deutet auf eine niedrige Möglichkeit einer Präzipitation und Steinbildung hin [Murthy 1982].

### **2.6.2 Der Kalzium/Magnesium-Quotient**

Ein hoher Kalzium/Magnesium-Quotient in Assoziation mit einer Hyperoxalurie wird als wichtiger Grund für die Bildung von Nierensteinen betrachtet [Gulati 1988, Rattan 1994].

### **2.6.3 Der Kalzium/Oxalat-Quotient**

Am Anfang jeder Nierensteinbildung steht eine vermehrte Tendenz zur Kristallisation im Harntrakt [Hess 1995]. In Fall der häufigsten kristallinen Phase, Kalziumoxalat, kristallisieren Kalzium- und Oxalationen in einem Verhältnis von 1:1; das molare Konzentrationsverhältnis im Urin hingegen beträgt 5:1 bis 10:1 zugunsten von Kalzium. Steigt nun also die Urinkalziumkonzentration ohne

gleichzeitigen Anstieg der Oxalatkonzentration an, können gar keine neuen Kalziumoxalatkristalle entstehen, da keine zusätzlichen freien Oxalationen für die Kristallbildung zur Verfügung stehen. Umgekehrt führt aber jeder auch noch so geringe Anstieg der Oxalatkonzentration im Urin wegen permanent vorhandenem Überschuss an Kalziumionen augenblicklich zur Kristallisation von Kalziumoxalat. Tatsächlich ist die Menge präzipitierter Kalziumoxalatkristalle in Urinen von Steinpatienten streng positiv mit der Oxalatkonzentration korreliert, steht aber in keiner Beziehung zur Kalziumkonzentration. Somit ist eine nur leichte Hyperoxalurie für die Steinbildung viel gefährlicher als eine Hyperkalziurie.

## **2.7 REZIDIVPROPHYLAXE UND THERAPIEMÖGLICHKEITEN**

### **2.7.1 Allgemeine Massnahmen**

Im Vordergrund stehen Massnahmen betreffend Flüssigkeitszufuhr und Ernährungsgewohnheiten [Smith 1992, Hess 1999]. Die heute übliche Wohlstands-ernährung mit einem Überangebot an Proteinen, alkoholischen Getränken und Kalorien führt zu einer Kumulation mehrerer diätetischer Risikofaktoren [Roth 1993]. Eine ausgewogene Mischkost mit ausreichender Harnverdünnung kann das Steinbildungsrisiko um ca. 50% senken.

Eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme führt zur Minderung der Kristallisationsneigung, da es zur Konzentrationsabnahme lithogener Substanzen [Erwin 1976, Roth 1993] und einer erhöhten Strömungsgeschwindigkeit im intrarenal-tubulären und extrarenal-luminalen System kommt [Roth 1993]. Das Ziel einer erhöhten Flüssigkeitszufuhr ist ein tägliches Urinvolumen von mindestens 2.5 Litern in Männern und mindestens 2.0 Litern in Frauen [Smith 1992].

Eine faser- und ballaststoffreiche Ernährung führt zu einer Abnahme der Kalziumausscheidung im Urin [Roth 1993]. Ursache ist eine Kalziumbindung im Darm durch Ballaststoffe mit verminderter intestinaler Absorption.

Eine allgemeine Restriktion der Proteinzufuhr ist empfehlenswert [Pak 1993, Roth 1993], da Proteine eine azidotische Stoffwechsellage bedingen [Roth 1993]. Die Folge ist neben einer Abnahme des Urin-pH eine Verminderung der Ausscheidung von Zitronensäure und eine erhöhte Kalziumausscheidung.

Kohlehydrate führen zu einer glucoseinduzierten Hyperkalziurie und postprandialen Hyperoxalurie mit erhöhtem Steinbildungsrisiko.

Alkoholische Getränke wiederum bedingen eine Harnansäuerung und steigern die Harnsäureausscheidung.

Ferner ist eine Restriktion von oxalatreichen Nahrungsmitteln (z.B. Spinat, Rhabarber) empfehlenswert [Kanig 1985, Radermacher 1992].

### **2.7.2 Phytopharmaka**

Die Wirksamkeit von Phytopharmaka in der Harnsteinmetaphylaxe wurde durch zahlreiche klinische Prüfungen und in der Praxis nachgewiesen [Hesse 1984, Schneider 1985, Ahsan 1989, Grases 1994]. Wegen der geringen Nebenwirkungen und der sehr guten Patientencompliance sind Phytopharmaka für die Langzeitrezidivprophylaxe besonders geeignet [Schneider 1994].

### **2.7.3 Medikamentöse Therapie**

Bei fortbestehender Ursache der Steinbildung muss die medikamentöse Rezidivprophylaxe in der Regel eine Langzeittherapie sein, mit allen Problemen der Nebenwirkungen und der Patientencompliance [Schneider 1994]. Deshalb sollte eine medikamentöse Langzeitrezidivprophylaxe immer erst begonnen werden, wenn alle Möglichkeiten einer allgemeinen Metaphylaxe ausgeschöpft sind.

Bis 1977 erfolgte die medikamentöse Metaphylaxe mittels der Wirkstoffe Magnesium, Sukzinat, Pyridoxin, Pyrophosphat, Diphosphonate, Methylenblau, Anthrachinone, Kationenaustauscher, Chlorothiazide und Allopurinol [Schneider 1977]. Heute werden v.a. drei Substanzen empfohlen, nämlich Alkalizitrat, Thiazide und Allopurinol, letzteres allerdings ausschliesslich bei Kalziumsteinpatienten mit Hyperurikosurie [Hess 1999].

#### **2.7.3.1 Magnesium**

In einer Studie, durchgeführt mit Ratten unter verschiedenen Diäten, zeigte sich, dass eine Magnesiumsupplementation (1.) die Oxalatausscheidung erniedrigte und auch eine Hyperkalziurie kontrollierte, und (2.) sie signifikant die Zitratexkretion erhöhte und somit auch das Potential an Inhibitoren, gerichtet gegen eine Kalziumoxalatkrystallisation, erhöhte [Gulati 1988]. Magnesium bildet mit Oxalat einen löslichen Komplex, führt zu einem Absinken der freien Ionenaktivität von Oxalat und dadurch zu einer Erniedrigung der Supersaturation von Kalziumoxalat [Smith 1992].

#### **2.7.3.2 Vitamin B6**

Siehe Kapitel "3 Vitamin B6 - Pyridoxin".

#### **2.7.3.3 Kaliumzitrat**

Zitrat agiert als Inhibitor der Kristallbildung von Kalziumsalzen [Smith 1992], wobei das Zitrat dieses Medikaments zu Bikarbonat metabolisiert wird, zu einer minimalen metabolischen Alkalose führt und dadurch zu einer Erhöhung der Zitratausscheidung im Urin [Goldfarb 1999].

#### **2.7.3.4 Chlorothiazide**

Der Wirkungsmechanismus beruht hier auf einer Senkung der Harnkalziumausscheidung [Erwin 1976, Schneider 1977, Kanig 1985, Goldfarb 1999] durch vermehrte Kalziumrückresorption im distalen Nephron.

#### **2.7.3.5 Allopurinol**

Als Inhibitor der Xanthinoxidase hemmt Allopurinol die Harnsäurebildung [Kanig 1985] und führt dadurch zu einer Senkung der Harnsäureausscheidung im Urin [Erwin 1976, Schneider 1977, Goldfarb 1999].

### 3 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Nephrolithiasis ist ein bekanntes Leiden mit einer Prävalenz von 4-6% in Deutschland [Stein 1995] und 5-10% in den USA [Pak 1993]. Rund 80% aller Nierensteine bestehen aus Kalziumoxalat und/oder Kalziumphosphat [Hess 1995]. Wichtigste Risikofaktoren für eine vermehrte Kristallisation von Kalziumoxalat im Urin sind zu geringe Harnvolumina, Hyperoxalurie und Hypozitraturie.

Ein chronisch zu tiefes Harnvolumen ist nach wie vor der wohl wichtigste Risikofaktor der Nierensteinbildung; bei abnehmenden Harnmengen unter 1200ml/24h steigt die Übersättigung und somit das Risiko der Steinbildung im Urin exponentiell an.

Die meisten Patienten mit einer Hyperoxalurie haben ein diätetisches Problem. Eine geringe bis mässige Hyperoxalurie kann aufgrund der Konsumation von oxalatreichen Nahrungsmitteln wie z.B. Spinat, Nüsse, Schokolade und Tee entstehen [Pak 1993]. Zusätzlich tritt eine Hyperoxalurie auf (1.) bei der primären Hyperoxalurie, (2.) bei Pyridoxinmangel, (3.) selten bei einer exzessiven Einnahme von Vitamin C und (4.) bei einer erhöhten Absorption von Oxalat, was als enterale Hyperoxalurie bezeichnet wird [Goldenberg 1996].

Eine Hypozitraturie wird je nach Studie in 19-63% aller Nierensteinpatienten gefunden [Hess 1995]. Die negativ geladenen Zitrationen bilden im Urin mit Kalzium lösliche Komplexe, wodurch die Konzentration des freien ionisierten Kalziums gesenkt und die Übersättigung bezüglich Kalziumoxalat effizient reduziert wird.

Die Hyperkalziurie als direkte Ursache vermehrter Kristallisation im Urin hingegen ist von sekundärer Bedeutung: Kalzium und Oxalat präzipitieren in Verhältnis von 1:1, während im Urin permanent ein molares Konzentrationsverhältnis von rund 10:1 zugunsten von Kalzium vorliegt. Ein Anstieg der Urinkalziumkonzentration ohne gleichzeitigen Anstieg der Oxalatkonzentration produziert deshalb keine zusätzlichen Kristalle, während jeder noch so geringe Anstieg der Oxalatausscheidung immer von vermehrter Kristallisation gefolgt ist. Eine kalziumarme Diät ist deshalb nicht nur unnötig, sondern wegen der Gefahr der sekundären Hyperoxalurie und der Osteopenie kontraindiziert.

Eine übermässige Zufuhr an tierischen Eiweissen hingegen verstärkt eine Hyperoxalurie und Hypozitraturie und begünstigt via Zunahme der Urinkalziumausscheidung eine negative Kalziumbilanz.

Die heute verfügbaren modernen Behandlungsmethoden und Therapiemöglichkeiten haben zu einem grundlegenden Wandel in der Behandlung des Steinleidens geführt [Schneider 1994]. Aber auch diese beeinflussen nur das Endprodukt der Steinerkrankung, das Konkrement, nicht die Ursachen seiner Bildung. Wichtigste Aufgabe bleibt deshalb weiterhin die Verhinderung der Steinbildung überhaupt (Prophylaxe) oder zumindest deren wiederholten Steinbildung (Metaphylaxe).

### 3 VITAMIN B6 - PYRIDOXIN

#### 1 EINLEITUNG

Das Vitamin B6 erwies sich als eines der am schwierigsten zu definierenden B-Vitamine [Kieffer 1988]. Es wurde im Zeitraum von 1934-1937 von den anderen Mitgliedern des Vitamin-B-Komplexes differenziert, und die Substanz, heute bekannt als Pyridoxin oder Pyridoxol, wurde mit Hilfe von Versuchen an Ratten in vier verschiedenen Labors 1938 unabhängig voneinander isoliert [Hoff-Jørgensen 1966]. 1939 wurde durch zwei Gruppen auch die Struktur bestimmt. Weil es zur Hauptsache an Proteine gebunden ist, liess es sich nicht aus den üblichen Extrakten der bekannten vitaminreichen Rohstoffe isolieren [Kieffer 1988]. Aus demselben Grunde wurde es auch so lange Zeit übersehen. 1945 stand dann fest, dass in der Natur drei verschiedene Formen von Vitamin B6 vorkommen, welche im Körper enzymatisch ineinander umgewandelt werden können und daher auch die gleiche Vitaminwirkung besitzen.

Dies sind:

- Pyridoxin, ein Alkohol (Grundform; als Hydrochlorid die Handelsform)
- Pyridoxal, ein Aldehyd
- Pyridoxamin, ein Amin.

Alle drei Formen enthalten eine phenolische und eine oder zwei alkoholische Hydroxylgruppen. An die letztere, die 5'-Gruppe, wird im Organismus meistens ein Phosphatrest gebunden. Nur die Phosphatformen der drei Pyridoxinverbindungen haben Koenzymaktivität.

#### 2 VITAMIN B6 IM ENGEREN SINNE

##### 2.1 NOMENKLATUR GEMÄSS DEN REGELN DER IUPAC

Die erste natürlich vorkommende Form von Vitamin B6 wurde 1938 isoliert [International Union for Pure and Applied Chemistry 1973a, 1973b] und ein Jahr später wurde dessen Struktur, ein 3-Hydroxy-4,5-bis(Hydroxymethyl)-2-Methylpyridin (I; R =  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , Abk. PN), durch chemische Synthese bestätigt. Der für diese Verbindung durch P. György vorgeschlagene Trivialname "Pyridoxin", wurde allgemein als Synonym für "Vitamin B6" verwendet. Gemäss den 1973 von der International Union for Pure and Applied Chemistry, Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), erstellten Regeln sollte diese Bezeichnung jedoch nicht als Oberbegriff synonym mit "Vitamin B6" verwendet werden, da die Bezeichnung "Vitamin B6" als allgemeiner Deskriptor für alle 3-Hydroxy-2-Methylpyridin-Derivate verwendet werden sollte, die in Ratten qualitativ die biologische Aktivität von Pyridoxin aufweisen.

Zwei andere natürliche Verbindungen, 1944 entdeckt und erkannt als Aldehyd, oder 4-Formyl-Analogon (I; R =  $-\text{CHO}$ , Abk. PL) von Pyridoxin, und das ent-

sprechende Amin, oder 4-Aminomethyl-Analogon (I;  $R = -CH_2NH_2$ , Abk. PM), wurden als "Pyridoxal" bzw. "Pyridoxamin" bezeichnet.

Die häufig vorkommenden oxidierten Metaboliten von Pyridoxal, nämlich 3-Hydroxy-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyridin-4-Carboxylsäure (III) und das entsprechende Lacton (IV) wurden als 4-Pyridoxinsäure resp. 4-Pyridoxolacton benannt. Daneben existieren aber auch 5'-Phosphorsäureester von Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin (II;  $R = -CH_2OH$ ,  $-CHO$ ,  $-CH_2NH_2$ ), welche als Pyridoxin 5'-Phosphat (oder Pyridoxin-5'-P, Abk. PNP), Pyridoxal 5'-Phosphat (oder Pyridoxal-5'-P, Abk. PLP) bzw. Pyridoxamin 5'-Phosphat (oder Pyridoxamin-5'-P, Abk. PMP) bezeichnet wurden.

In Abbildung 2 sind die Strukturformeln der erwähnten Vitamere abgebildet.

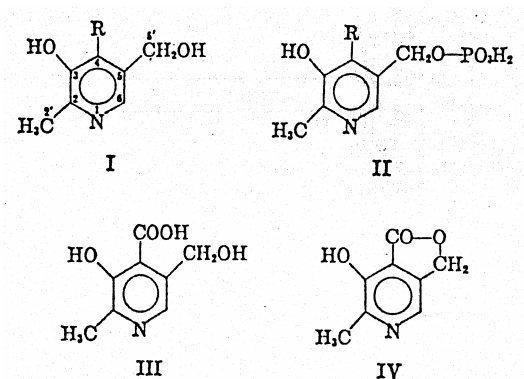


Abbildung 2: Strukturformeln von Pyridoxin (I;  $R = -CH_2OH$ ), Pyridoxal (I;  $R = -CHO$ ), Pyridoxamin (I;  $R = -CH_2NH_2$ ), 4-Pyridoxinsäure (III), 4-Pyridoxolacton (IV), Pyridoxin 5'-Phosphat (II;  $R = -CH_2OH$ ), Pyridoxal 5'-Phosphat (II;  $R = -CHO$ ) bzw. Pyridoxamin 5'-Phosphat (II;  $R = -CH_2NH_2$ )

## 2.2 VORKOMMEN VON VITAMIN B6

Vitamin B6 ist in der belebten Natur weit verbreitet [Hartke 1986c]. In den Pflanzen entsteht es biosynthetisch, während Tiere es mit der Nahrung aufnehmen oder über die Darmflora bilden. Für die Versorgung des Menschen mit Vitamin B6 sind Kartoffeln, grünes Gemüse, Getreide, Leber, Muskelfleisch und Hefe von Bedeutung. Bierhefe weist den grössten Gehalt auf. Die einzelnen Vitamin-B6-Formen sind für den Tierorganismus gleichermassen verwertbar. Der Bedarf an Vitamin B6 kann daher mit Pyridoxin allein gedeckt werden, z.B. in Form von Pyridoxinhydrochlorid. Diese Substanz spielt auch bei der Herstellung von Vitaminpräparaten oder bei der Vitaminierung von Futter- und Lebensmitteln die grösste Rolle.

## 2.3 CHEMISCH / PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON PYRIDOXINHYDROCHLORID

### 2.3.1 Synonyme

Pyridoxinhydrochlorid [EDI 1995], Pyridoxini hydrochloridum, Pyridoxinium chloratum, Pyridoxolhydrochlorid [Hartke 1986c]



### **2.3.2 Strukturformel**

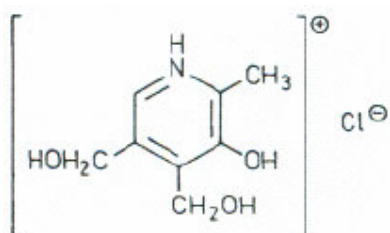


Abbildung 3: Strukturformel von Pyridoxinhydrochlorid [EDI 1995]

### **2.3.3 Summenformel**

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub> [EDI 1995]

### **2.3.4 Molekulargewicht**

205.6 g/mol [EDI 1995]

### **2.3.5 Eigenschaften**

Die Handelsware ist ein weisses bis fast weisses, kristallines, höchstens schwach nach Salzsäure riechendes Pulver mit saurem, leicht bitterem Geschmack und kristallisiert in farblosen Prismen, Täfelchen oder doppelbrechenden Stäbchen [Hartke 1986c].

### **2.3.6 Löslichkeit**

Pyridoxinhydrochlorid ist leicht löslich in Wasser [EDI 1995], d.h. 1 Teil Substanz löst sich bei 20 °C in etwa 5 Teilen Wasser [Hartke 1986c].

### **2.3.7 Schmelzpunkt**

Die Substanz schmilzt bei etwa 205 °C unter Zersetzung [EDI 1995].

### **2.3.8 Stabilität**

Pyridoxinhydrochlorid ist sowohl in trockenen Mischungen als auch in saurer Lösung gut haltbar [Hartke 1986c]. Mineralsaure Lösungen können 30 Minuten bei 120 °C sterilisiert werden. Bei Erhitzen der neutralen Lösung (30 Minuten bei 120 °C) wird Dimerisierung beobachtet.

Die an der Luft beständige Substanz zersetzt sich unter Lichteinwirkung, besonders durch UV-Strahlen. Die Arzneibücher schreiben daher Aufbewahrung unter Lichtschutz vor.

### **2.3.9 Inkompatibilitäten**

Kombinationen von Pyridoxinhydrochlorid mit Eisenpräparaten oder eisenhaltigen Wirk- bzw. Hilfsstoffen sind wegen der Bildung eines gefärbten Fe-Komplexes unverträglich [Hartke 1986c]. Eine weitere Inkompatibilität besteht mit Oxidationsmitteln [EDI 1995].

### **2.3.10 Handelsnamen**

Im Handel sind zahlreiche Präparate erhältlich, sei es in Kombination oder auch als Monopräparate. Beispiele von Monopräparaten sind:

- Benadon Roche, Tabletten 300mg (Roche)
- Burgerstein Vitamin B6, Tabletten 100mg (Antistress)
- Comploment Continus, Tabletten retard (Mundipharma)
- Vitamin B6 Streuli, Tabletten 300mg (Streuli)
- Vitamin B6 Streuli, Tabletten 40mg (Streuli)

## **2.4 EIGENSCHAFTEN / WIRKUNGEN**

Pyridoxin wird im Organismus durch Oxidation und Phosphorylierung in seine Wirkform Pyridoxal 5'-Phosphat überführt [Hartke 1986c]. Diese ist das Koenzym zahlreicher Enzyme, die Transaminierungen, Desaminierungen, Decarboxylierungen, Desulfhydrierungen sowie Spaltung und Synthese von Aminosäuren ermöglichen [Hartke 1986c, Morant 1994a]. Die meisten dieser Enzyme befinden sich in der Leber [Kieffer 1988]. Pyridoxin ist somit für den Eiweissstoffwechsel von zentraler Bedeutung und an der Synthese von Körpereiwiss, ferner an der Blutbildung, der Muskelfunktion und der Funktion des ZNS beteiligt [Hartke 1986c]. Pyridoxal 5'-Phosphat ist ferner im Gehirnstoffwechsel an der Bereitstellung der für die synaptischen Übertragungen notwendigen biogenen Amine sowie der Transmittersubstanz  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) beteiligt [Morant 1994a].

Bei einem durchschnittlichen Proteinkonsum von 40-70 g pro Tag benötigen Erwachsene täglich 1.8-2.2 mg Pyridoxin [Kieffer 1988]. Weil der gesamte Proteinstoffwechsel von pyridoxinabhängigen Enzymen beherrscht wird, steigt mit zunehmendem Eiweisskonsum auch der Pyridoxinbedarf entsprechend an [Kieffer 1988, Morant 1994a]. Ebenfalls erhöht ist der Bedarf in der Schwangerschaft und bei Hyperthyreose [Hartke 1986c].

Zur Bildung von Pyridoxalphosphat aus Pyridoxin ist übrigens Vitamin B2 notwendig, genauer gesagt ein Enzym, welches durch Riboflavin aktiviert wird [Kieffer 1988].

## **2.5 PHARMAKOKINETIK**

### **2.5.1 Absorption**

Die Absorption von Pyridoxin erfolgt im oberen Dünndarm durch passive Diffusion [Morant 1994a]. Die Resorption erfolgt rasch [Hartke 1986c].

### **2.5.2 Distribution / Metabolismus**

Nach rascher Umwandlung von Pyridoxin in die aktiven Formen Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat erfolgt deren Speicherung hauptsächlich in der Leber, wo freies Pyridoxal unter Einwirkung von Aldehydoxidase auch zu 4-Pyridoxinsäure oxydiert wird [Morant 1994a].

Pyridoxalphosphat macht mindestens 60 % des zirkulierenden Vitamin B6 aus, penetriert in dieser Form die Zellmembranen und bildet einen Bestandteil aller Körperzellen. Die optimale Wirkkonzentration im Plasma liegt bei 60 nmol pro

Liter. Unter nahezu Vitamin-B6-freier Diät sinkt die Vitamin-B6-Konzentration im Blut nach dreissig Tagen auf nicht mehr messbare Werte ab [Daunderer 1981]. Entsprechend ist auch die Ausscheidung im Harn nach dem gleichen Zeitraum vermindert.

In Abbildung 4 ist die metabolische Transformation von Vitamin B6 dargestellt.

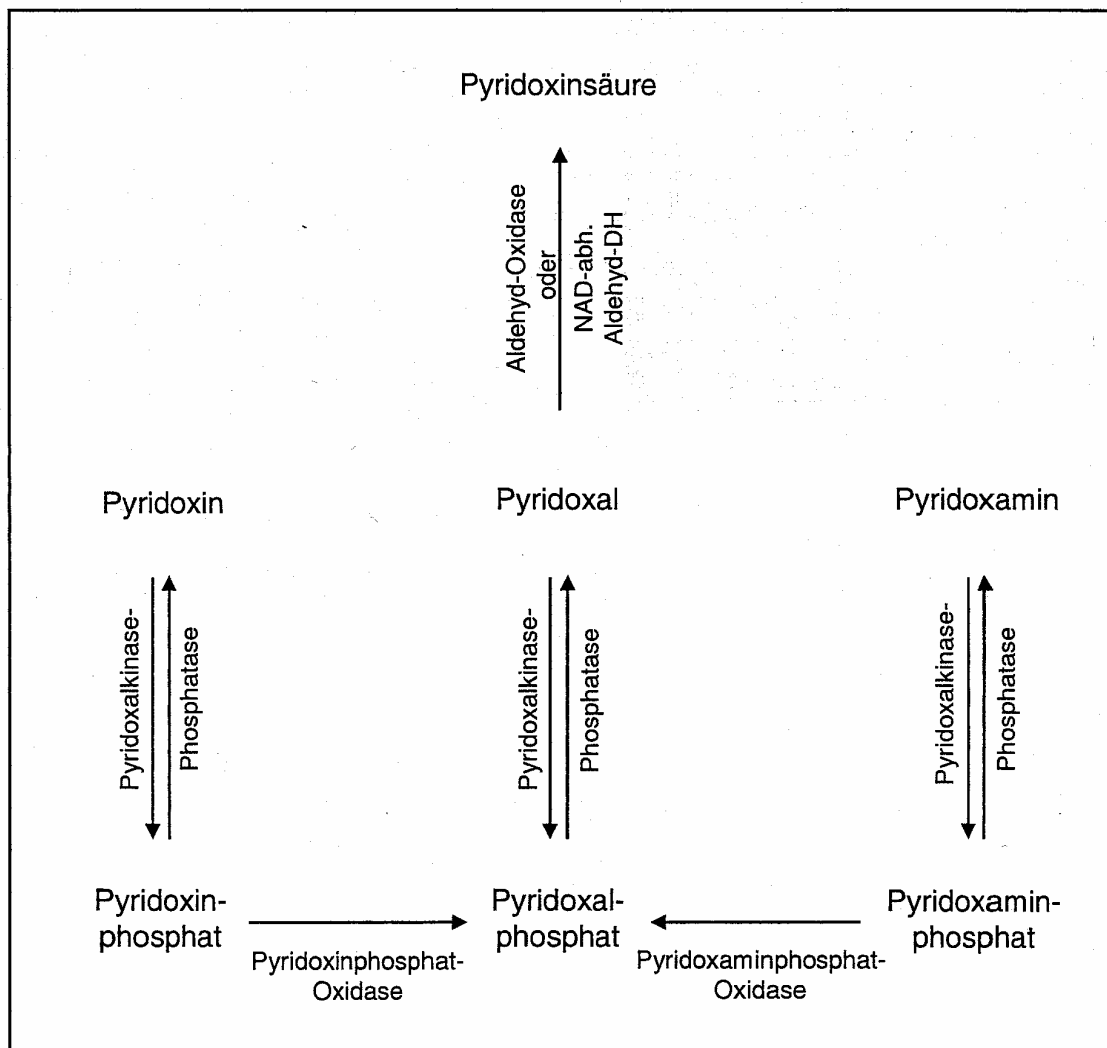


Abbildung 4: Metabolische Transformation von Vitamin B6 in der Leber, modifiziert nach [Hoff-Jørgensen 1966, Ink 1984, Lumeng 1984]

### **2.5.3 Elimination**

Hauptausscheidungsprodukt im Harn ist die 4-Pyridoxinsäure [Daunderer 1981, Hartke 1986c, Morant 1994a], deren Bestimmung auch zur Diagnose eines Vitamin-B6-Mangels herangezogen werden kann [Hartke 1986c]. Ein Teil von Vitamin B6 wird auch mit den Fäzes ausgeschieden [Morant 1994a]. Beim Erwachsenen beträgt die Ausscheidung 0.05-0.1  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht pro Tag [Hartke 1986c]. Ferner sinkt die Eliminationshalbwertszeit mit steigender

Dosis [Morant 1994a].

## 2.6 INDIKATIONEN / ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Die folgenden Indikations- und Anwendungsmöglichkeiten werden in der Literatur aufgeführt:

- Homozystinurie [Daunderer 1981]
- Zystathioninurie
- Primäre Oxalose vom Typ I
- Durch Vitamin-B6-Mangel [Hartke 1986c, Morant 1994a] verursachte Tremorzustände und Krämpfe [Hartke 1986c]
- Prophylaxe und Therapie von Mangelerscheinungen infolge Behandlung mit Vitamin-B6-Antagonisten [Morant 1994a]
- Erhöhter Bedarf während Schwangerschaft und Laktation sowie bei Einnahme oraler Kontrazeptiva
- Prämenstruelles Syndrom [Daunderer 1981]
- Degenerative Gelenkerkrankungen
- Karpaltunnelsyndrom
- Neurologische Nebenwirkungen bei INH- oder Cycloserintherapie [Hartke 1986c]
- Als Adjuvans bei Strahlentherapie [Morant 1994a]
- Auf Pyridoxin ansprechende Krämpfe [Morant 1994a] und Anämien [Hartke 1986c, Morant 1994a]
- Bei Vergiftungen mit Isoniazid, Antibiotika, Antibabypille, Glutamat, Penicillamin, D-Cycloserin [Daunderer 1981].

## 2.7 DOSIERUNG / ANWENDUNG

### 2.7.1 Übliche Dosierung

Je nach Indikation und Autor beträgt die täglich applizierte Dosis 10 [Murthy 1982, Edwards 1991, Shah 1992, Rattan 1994], 50 [Hartke 1986c, Edwards 1991, Morant 1994a], 100 [Tomson 1989, Costello 1992], 200 [Tiselius 1977b, Edwards 1991], 300mg [Balcke 1983, Hartke 1986c, Morant 1994a], 400mg [Gill 1986, Edwards 1991] oder bis zu 800mg [Edwards 1991].

### 2.7.2 Anwendung

Tabletten werden unzerkaut mit einem halben Glas Flüssigkeit eingenommen [Morant 1994a].

## 2.8 ANWENDUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

### 2.8.1 Kontraindikationen

Überempfindlichkeit gegen Vitamin B6 [Morant 1994a]

### 2.8.2 Vorsichtsmassnahmen

Vitamin B6 beschleunigt den Abbau von medikamentös zugeführtem Levodopa und vermindert damit seine Wirksamkeit [Morant 1994a]. Patienten, die mit Levodopa behandelt werden, sollten daher nicht gleichzeitig Vitamin B6 in Dosen

einnehmen, die den Tagesbedarf von 2mg um ein Vielfaches übersteigen.

### **2.8.3 Schwangerschaft / Stillzeit**

Schwangerschafts-Kategorie C [Morant 1994a]

## **2.9 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN**

In höheren Dosen kann es vorübergehend zu Sodbrennen, Übelkeit und Verdauungsstörungen kommen [Morant 1994a]. Gelegentlich kann Vitamin B6 auch eine bestehende Akne vulgaris verstärken oder ein der Akne ähnliches Ekzem hervorrufen [Morant 1994b].

Vor der Einnahme von Vitamin B6 in hohen Dosen durch Laien muss jedoch ausdrücklich gewarnt werden: Es sind mehrere Fälle bekannt geworden, bei denen es nach zwei bis 40 Monaten der Pyridoxin-Therapie zu einer peripheren sensorischen Neuropathie mit ataktischen Gangstörungen, Reflexstörungen und Beeinträchtigung von Tast-, Vibrations- und Temperatursinn gekommen war [Dauser 1981]. Anatomisch lag eine unspezifische axonale Degeneration an peripheren sensiblen Nerven vor, die nach Absetzen von Vitamin B6 innerhalb eines halben Jahres weitgehend bis vollständig gebessert wurde.

## **2.10 INTERAKTIONEN**

Vitamin B6 hebt in grösseren Dosen die Wirkung von Levodopa auf [Morant 1994a]. Vitamin B6 in hohen Dosen kann mit der Prolactinfreisetzung interferieren. Im Gegensatz dazu schwächen Isoniazid, Penicillamin und D-Cycloserin die Wirkung von Vitamin B6 [Morant 1994b].

## **2.11 HYPOVITAMINOSE**

Nahrungsbedingte Mangelercheinungen an Vitamin B6 sind sehr selten [Hartke 1986c]. Ein für den Vitamin-B6-Mangel typisches Symptom gibt es nicht, da die Funktionen dieses Vitamins zu vielfältig sind [Kieffer 1988].

Klinische Situationen von Vitamin-B6-Mangel können auftreten bei Resorptionsstörungen, Schwangerschaftserbrechen, Einnahme oraler Kontrazeptiva, prämenstruellem Syndrom, Alkoholabusus, pyridoxinabhängigen Anämien und Krämpfen, Einnahme von Vitamin-B6-Antagonisten, einigen Antibiotika und Chemotherapeutika sowie bei Radium- und Röntgenbestrahlung [Morant 1994a].

Ein Vitamin-B6-Mangel äussert sich zuerst in verschiedenartigen Hautkrankheiten, rissiger Haut, Anämie, aber auch durch nervöse Störungen, Depression, Nierensteinbildung [Kieffer 1988], aber auch durch Erosionen an der Mundschleimhaut und an den Lippen, Glossitis, Polyneuritis und epileptiformen Krämpfen [Hartke 1986c].

## **2.12 ANTAGONISTEN**

Als klassischer Vertreter aus der Gruppe der Vitamin-B6-antagonistisch wirkenden Verbindungen gilt das 4'-Desoxypyridoxol-5-Hydroxymethyl-2,4-dimethylpyridinol, das sowohl im mikrobiologischen Versuch an *Saccharomyces*

carlsbergensis als auch im Rattenwachstumstest auf seine Antivitamin-B6-Wirksamkeit geprüft wurde und heute vielfach als Bezugssubstanz für Antivitamin-B6-Testungen eingesetzt wird [Körner 1967].

Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Vitamin-B6-Antagonisten: (a) Strukturanalogue von einem B6 Vitamer oder (b) Carbonylreagenzien - reaktive Hydrazine oder Hydroxylamine, die fähig sind, Hydrazone oder Oxime mit Pyridoxal oder Pyridoxalphosphat zu bilden [Klosterman 1979]. Beispiele für Vitamin-B6-Antagonisten natürlichen Ursprungs sind: 1-Amino-D-Prolin (Linum usitatissimum), Methylhydrazin (Gyromitra esculenta), L-Canalin (Lotoidae spp.), D-Cycloserin (Actinomyces spp.) und O-Amino-D-Serin (Rattenurin).

Weitere Beispiele von Vitamin-B6-Antagonisten sind: Isoniazid [Hoff-Jørgensen 1966, Morant 1994a], Penicillamin [Morant 1994a], Hydralazin, 4-Desoxypyridoxin und Thiosemicarbazon.

Auch das durch hydrolytische Spaltung des Thiaminmoleküls entstehende Pyramin (=Toxopyrimidin), das strukturell eine gewisse Ähnlichkeit zum Vitamin B6 aufweist, zeigt ausgeprägte Antivitamin-B6-Eigenschaften [Hoff-Jørgensen 1966, Körner 1967].

### 2.13 ÜBERDOSIERUNG / HYPERVITAMINOSE

Überdosierungen von Pyridoxin bis ca. 300mg pro Tag sind auch langfristig ungefährlich [Kieffer 1988]. Die langfristige Anwendung hoher Pyridoxin-Dosen (2-6g/Tag) kann jedoch zu neurotoxischen Schäden führen [Hartke 1986c]. In den USA ist es zu schweren Nervenschädigungen gekommen, als tägliche Dosen von 2g und mehr über mehrere Monate an psychiatrische Patienten verabreicht wurden [Kieffer 1988].

### 2.14 TOXIZITÄT / TOXIKOLOGIE

Die drei Vitamere Pyridoxol, Pyridoxal, Pyridoxamin sind weitgehend ungiftig [Daunderer 1981]. Ratten, Kaninchen und Hunde vertragen Gaben von 1g Pyridoxinhydrochlorid pro kg KG ohne nachteilige Wirkungen. Erst höhere Dosen, welche die therapeutisch wirksame Dosis um das Tausendfache übersteigen, können Koordinationsstörungen und Konvulsionen zur Folge haben. Im Tierversuch führten orale Gaben von 2-6g Vitamin B6 pro kg KG zu generalisierten Krämpfen und Tod. Die Erfahrungen mit hochdosierten Vitamin-B6-Dosen beim Menschen sind spärlich.

In den Tabellen 1 und 2 sind die akute Toxizität von Pyridoxinhydrochlorid und von Pyridoxal 5'-Phosphat aufgeführt und in der Tabelle 3 die subchronische Toxizität von Pyridoxinhydrochlorid.

Tabelle 1: Akute Toxizität (LD<sub>50</sub>) Pyridoxinhydrochlorid [Daunderer 1981]

Tierart	Per os [mg pro kg KG]
Maus	8400
Ratte	5500-15900

Tabelle 2: Akute Toxizität (LD50) Pyridoxal 5'-Phosphat

Tierart	Per os [mg pro kg KG]
Maus	2000

Tabelle 3: Subchronische Toxizität (LD50) Pyridoxinhydrochlorid

Tierart	Per os [mg pro kg KG und Tag]	Dauer [Tage]
Maus	7000	10
Ratte	7750	10

## 2.15 BESTIMMUNGSMETHODEN

Mögliche Bestimmungsmethoden der B6-Vitamerie werden im Kapitel "4.1 Entwicklung einer Messmethode für Pyridoxal 5'-phosphat und 4-Pyridoxinsäure" näher erläutert.

## 3 VITAMIN B6 UND OXALAT

### 3.1 ANGRIFFSORT VON VITAMIN B6 IM OXALATSTOFFWECHSEL

In Abbildung 1 ist der Angriffsort von Vitamin B6 dargestellt. 70-95% der täglichen Oxalatausscheidung hat einen metabolischen Ursprung, d.h. es entsteht indirekt via Glyoxylat oder direkt aus Tryptophan [Jaeger 1992]. Um eine exzessive Oxalatproduktion aus Glyoxylat zu verhindern, wird das letztere enzymatisch in Glycin transaminiert. Für diese enzymatische Reaktion benötigt das Apoenzym allerdings Vitamin B6 [Jaeger 1992], welches als Kofaktor dient [Latta 1990, Milliner 1994, Sutton 1994] und somit die Oxalatproduktion durch Enzyminduktion reduzieren kann [Milliner 1994].

### 3.2 ALLGEMEINE HYPOTHESE DER HYPEROXALURIE BEI VITAMIN-B6-MANGEL

Da Pyridoxin ein Kofaktor von Transaminasereaktionen ist, wird vermutet, dass, bedingt durch einen Vitamin-B6-Mangel, ein Absinken der Glycin-Glyoxylat-Transaminase-Reaktion den Glyoxylatpool erhöhen würde [Nath 1990]. Die erhöhte Produktion von Oxalat aus Glykolat und Glykolat-Precursoren (Ethylen-glykol, Xylitol, Ethanolamin) nach einem Vitamin-B6-Mangel kann erklärt werden durch das Ansteigen der Glykolat metabolisierenden Enzyme GAO (engl. Glycolic Acid Oxidase) und GAD (engl. Glycolic Acid Dehydrogenase). Die Situation wird kritisch, wenn es bei einem Vitamin-B6-Mangel zu einer Induktion der Oxalattransportcarrier in der intestinalen Bürstensaummembran und dadurch zu einer erhöhten Aufnahme von Oxalat kommt. Das Oxalat wird zum Blut transportiert, um via Niere ausgeschieden zu werden und dabei resultiert eine Hyperoxalurie.

### **3.3 PRÄKLINISCHE STUDIEN**

Die Kalziumoxalaturolithiasis ist die häufigste Nierensteinerkrankung des Menschen in der westlichen Hemisphäre [Khan 1991]. Um die Pathobiologie dieser Krankheit zu verstehen, wird allgemein die Ratte als in vivo-Modell verwendet, obwohl Ratten selten spontan Nierensteine bilden. Die Kalziumoxalaturolithiasis in Ratten wird deshalb experimentell mittels einer Hyperoxalurie induziert, entweder durch Vorläufersubstanzen von Oxalat, wie z.B. Ethylenglykol und Hydroxyprolin, oder auch durch diätetische Massnahmen, wie z.B. einen Pyridoxinmangel.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene klinische Studien mit Tieren durchgeführt, um die Effekte von Vitamin B6 auf den Oxalatstoffwechsel zu untersuchen und zu belegen. Die interessantesten Studien werden nachfolgend aufgeführt:

#### **3.3.1 Studien im Zusammenhang mit einem Vitamin-B6-Mangel**

- In verschiedenen Studien mit Ratten konnte gezeigt werden, dass bei einem Vitamin-B6-Mangel die Ausscheidung an Urinoxalat markant erhöht war [Richardson 1967, Yachiku 1969, Ribaya 1981].
- In männlichen Wistar-Ratten wurde der Effekt eines Vitamin-B6-Mangels auf die Oxalataufnahme untersucht [Nath 1990]. Dabei zeigte sich, dass in Vitamin-B6-defizitären Ratten im Vergleich zu Kontrollratten die Oxalataufnahmerate signifikant erhöht war.

#### **3.3.2 Studien mit Vitamin-B6-Supplementation**

- Durch chronische Intoxikation mit Ethylenglykol oder akute Vergiftung durch Na-Glyoxylat konnte im Tierversuch an Kaninchen eine Kalziumoxalatnephrolithiasis erzeugt werden [Schneider 1977]. An diesem Modell wurde der Einfluss von Magnesium, Pyridoxin und Phosphat untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Kombinationstherapie von Magnesium und Vitamin B6 die Ausbildung von Kalziumoxalatmikrolithen in der Niere vollständig verhindern konnte. Aufgrund der gefundenen Ergebnisse empfahlen die Autoren eine Magnesium-Vitamin-B6-Therapie in der Rezidivprophylaxe der Oxalaturolithiasis.
- In männlichen Wistar-Ratten wurde die Wirkung von Pyridoxin (10mg Pyridoxin-HCl/100g KG/24h) auf die Natriumglykolat induzierte Hyperoxalurie untersucht [Murthy 1981]. Dabei zeigte sich, dass grosse Dosen an Pyridoxin die induzierte Hyperoxalurie nicht erniedrigen konnten.
- In Tierversuchen bestätigte sich der inhibierende Einfluss von Pyridoxin und Magnesium auf die Ausbildung der Kalziumoxalaturolithiasis [Kridl 1984]. Die Verabreichung von Pyridoxin und/oder Magnesium an Versuchstiere beeinflusste vor allem die Ausbildung von Inkrustationen an den Nierenpapillen. Die alleinige Verabreichung von Ethylenglykol führte zur Bildung von makroskopischen Inkrustationen an den Nierenpapillen bei 100% der über-



lebenden Tiere. Fügte man den Tieren zum Futter Pyridoxin hinzu, so fand man diese Inkrustationen bei 66.6% der lebenden Tiere. Fügte man den Tieren zum Futter Magnesiumoxyd, so bildeten sich die makroskopischen Inkrustationen an den Nierenpapillen bei 14.2% der Tiere. Erhielten die Tiere gleichzeitig Pyridoxin und Magnesium, entwickelten sich makroskopische Inkrustationen an den Nierenpapillen bei 16.6% der überlebenden Tiere. Die erzielten Ergebnisse unterstrichen somit die berechnete Anwendung von Pyridoxin und Magnesium in der Prävention der Kalziumoxalaturolithiasis beim Menschen.

### **3.4 KLINISCHE STUDIEN DURCHGEFÜHRT AM MENSCHEN**

Auch im Menschen wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt. Nachfolgend sind die wichtigsten Studien im Zusammenhang mit Vitamin B6 aufgeführt.

#### **3.4.1 Vitaminzufuhr und Risiko eines Nierensteinleidens**

- In einer prospektiven Studie wurde von 45'251 Männern, im Alter von 40 bis 75 Jahren, ohne Nierensteinerkrankung, die Beziehung zwischen der Einnahme der beiden Vitamine B6 und C und dem Risiko von symptomatischen Nierensteinen untersucht [Curhan 1996]. Die Vitamineinnahme aus der Nahrung aber auch aus Supplementen wurde dabei anhand eines semiquantitativen Fragebogens abgeschätzt.

Während dem 6jährigen Follow-up wurden 751 Fälle von Nierensteinen beobachtet. Es zeigte sich, dass weder die Vitamin-B6- noch die Vitamin-C-Aufnahme signifikant mit einem Steinbildungsrisiko assoziiert war.

- Die Beziehung zwischen der Einnahme des Vitamins B6 und dem Risiko von symptomatischen Nierensteinen wurde in einer prospektiven Studie mit einer Kohorte von 85'557 Frauen durchgeführt, die bis anhin keine Nierensteine hatten [Curhan 1999]. Es wurden semiquantitative Fragebögen zur Erfassung des Vitaminkonsums in der Nahrung wie auch in Supplementen verwendet.

Während der 14jährigen Follow-up Periode wurden 1078 Fälle von Nierensteinen dokumentiert. Es zeigte sich, dass eine hohe Einnahme an Vitamin B6 umkehrt assoziiert ist mit dem Risiko einer Nierensteinbildung. Die Autoren schlossen aus den Befunden, dass grosse Dosen an Vitamin B6 das Risiko einer Nierensteinbildung bei Frauen reduzieren können.

#### **3.4.2 Studien mit Vitamin-B6-Supplementation**

- In einer Studie wurden 7 Nierensteinpatienten und 5 gesunde Freiwillige einer Pyridoxinbehandlung unterzogen, wobei während 3 Wochen zweimal täglich 100mg Pyridoxin eingenommen wurden [Tiselius 1977b]. Es wurde festgestellt, dass unter Pyridoxin die Oxalatausscheidung bei 9 von 12 Teilnehmern anstieg und lediglich bei drei Teilnehmern, drei Nierensteinpatienten, abnahm.

- Von 13 Kalziumoxalatnierensteinpatienten mit einer ausreichenden Vitamin-B6-Zufuhr wurden verschiedene Serum- und Urinparameter ausgewertet und zusätzlich in einer Studie der Einfluss einer 28tägigen Pyridoxinsupplementation (dreimal täglich 20mg) auf diese Parameter untersucht [Revúsová 1977].

Auf die Pyridoxinsupplementation folgte ein signifikantes Ansteigen der Serumkonzentration der Harnsäure; die übrigen Serumparameter veränderten sich nicht. Die Urinausscheidung von Kalzium, Phosphat, Magnesium, Natrium, Kalium und Harnsäure erhöhte sich leicht, während die Oxalatausscheidung leicht abnahm. Es wurden in dieser Studie keine signifikanten Veränderungen von Urinparametern gefunden sowie zwischen den Individuen eine hohe Variabilität im Wechsel. Aufgrund der Ergebnisse wird vermutet, dass Langzeitstudien notwendig sind, um die Faktoren, welche die Prävention und das Rezidiv von Steinen in Pyridoxin-behandelten Patienten erfolgreich beeinflussen, zu erforschen.

- In einer Studie wurden 24 Erwachsene mit einem rezidivierenden Kalziumoxalatnierensteinleiden mit einer täglichen Dosis von 20mg Pyridoxin behandelt [Revúsová 1982]. Dabei wurden verschiedene Serum- und Urinparameter untersucht.

Der für die Kalziumoxalatnephrolithiasis am meisten relevante Faktor, eine Abnahme der Oxalurie, wurde in dieser Studie mit einer täglichen Dosis von 20mg Pyridoxin nicht erreicht.

- In einer Studie wurden 12 Patienten, die an einem rezidivierenden Nierensteinleiden mit idiopathischer Hyperoxalurie litten, täglich Dosen von 250-500mg Pyridoxin verabreicht [Mitwalli 1988]. Die Dauer der Behandlung war je nach Patient individuell unterschiedlich und reichte von 14 bis zu 47 Monaten unter Pyridoxin.

Innerhalb von 18 Monaten erniedrigte sich unter dieser Therapie die Oxalatausscheidung im Urin signifikant ( $p < 0.025$ ), wobei die Abnahme in den ersten 6 Monaten ausgeprägter war ( $p < 0.001$ ). In diesem Zeitraum zeigten 8 Patienten keine Anzeichen einer neuen Steinbildung und auch kein Grössenwachstum an noch vorhandenen Steinen. Drei der 12 Patienten zeigten in einem frühen Stadium der Behandlung ein leichtes Grössenwachstum von bereits bestehenden Steinen. Bei zwei dieser drei Patienten kam es danach zu einer Stabilisierung, beim dritten Patienten kam es zu einem spontanen Abgang des Steins. Ein einziger Patient bildete kurz nach der Behandlung einen neuen Stein. Nach dem Abgang dieses Steins hatte dieser Patient radiologisch keine Anzeichen eines Steins mehr. Keiner der Patienten entwickelte irgendwelche signifikanten Komplikationen. Aufgrund der gefundenen Resultate unterstützen die Autoren die Ansicht, dass Pyridoxin in pharmakologischen Dosen zur Kontrolle einer erhöhten Oxalatausscheidung in Patienten mit rezidivierenden Oxalatsteinen nützlich ist.

- Eine Gruppe von 30 Patienten mit einer rezidivierenden Kalziumoxalatnephrolithiasis wurde während 6 bis 24 Monaten mit Pyridoxin behandelt [Revúsová 1978]. Dabei wurden auch Serum- und Urinuntersuchungen durchgeführt.

Entsprechend früheren Befunden der Autoren wurde auch bei dieser Studie ein Absinken der Oxalurie beobachtet. Ein noch ausgeprägteres Absinken wurde bei denjenigen Patienten beobachtet, die länger als ein Jahr behandelt worden waren. Allerdings wurden auch negative Konsequenzen einer Pyridoxinbehandlung nachgewiesen, so pathologisch erhöhte Werte einer Urikämie in einigen Patienten und ein erhöhter Mittelwert des Urinkalziums in der gesamten Gruppe der Patienten. Aufgrund der gefundenen Resultate empfehlen die Autoren eine gewisse Vorsicht gegenüber der präventiven Behandlung von Patienten mit Pyridoxin.

- In einer Studie erhielten gesunde Freiwillige und Patienten unterschiedliche Dosen an Pyridoxin [Edwards 1991]. Bei allen Teilnehmern, bei den Gesunden, bei 7 Patienten mit einer primären Hyperoxalurie Typ I und bei 8 Patienten mit einer leichten metabolischen Hyperoxalurie wurden die Pyridoxinmetaboliten im Plasma und die 4-PA-Ausscheidung im Urin gemessen. Die Compliance der Teilnehmer wurde überprüft mittels Messung der 4-PA im Urin.

Die Konzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat bei den Gesunden (626nmol/l) war unabhängig von der gegebenen Pyridoxindosis, und der maximale Plasmaspiegel an Pyridoxal 5'-Phosphat wurde bereits mit 10mg Pyridoxin pro Tag erzielt. Die Patienten wurden eingeteilt gemäss dem Abfall der Oxalat- und Glykolatexkretion in "Nonresponders", "Good Responders" und in "Partial Responders". Die Konzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat schien bei den Patienten mit einer primären Hyperoxalurie (514nmol/l) niedriger als bei den gesunden Freiwilligen. Patienten mit einer leichten metabolischen Hyperoxalurie hatten eine niedrigere Konzentration als die Gesunden ( $p < 0.01$ ). Bei den Patienten mit einer leichten metabolischen Hyperoxalurie war die Pyridoxal-konzentration bei den "Partial Responders" (282nmol/l) tiefer als bei den "Good Responders" (396nmol/l) ( $p = 0.04$ ). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen und den Gesunden war statistisch hoch signifikant ( $p < 0.001$ ). Die Ausscheidung an 4-PA betrug bei den Gesunden im Mittel 49.8% ( $n = 10$ ), bei den Patienten mit einer leichten metabolischen Hyperoxalurie 55.3% ( $n = 8$ ) und bei den Patienten mit einer primären Hyperoxalurie 55.5% ( $n = 5$ ) der eingenommenen Dosis. Die Autoren schliessen aus ihren Resultaten, dass bei einer leichten metabolischen Hyperoxalurie Schwierigkeiten bestehen könnten in der Umwandlung von Pyridoxin in Pyridoxal 5'-Phosphat. Diese Schwierigkeiten scheinen jedoch nicht aus einer reduzierten Absorption von Pyridoxin aus den Gastrointestinaltrakt zu bestehen, da die 4-PA-Ausscheidung im 24h-Urin und die 4-PA-Konzentration im Plasma nicht kleiner waren als bei den gesunden Freiwilligen, die die gleiche Dosis erhielten.

- In einer Studie wurde der Effekt von 200mg Pyridoxinhydrochlorid per os während einer Dauer von drei Wochen auf die Oxalatkonzentration im Plasma als auch auf die Oxalatausscheidung im Urin untersucht [Edwards 1990]. Die Teilnehmer, zehn gesunde Freiwillige (vier Frauen, sechs Männer) und sieben Kalziumoxalatsteinpatienten mit einer idiopathischen Hyperkalziurie (sechs Männer, eine Frau), standen sowohl 4 Tage vor Beginn als auch während der Einnahme der Tabletten auf einer oxalat- und ascorbatarmen Diät.

Es zeigte sich, dass die Patienten ein statistisch signifikant grösseres Urinvolumen als die Gesunden ( $p < 0.01$ ) hatten. Die Oxalatausscheidung im Urin bei den Patienten war signifikant höher als bei den Gesunden. Die Pyridoxinsupplementation führte bei den Patienten nicht zu einer Erniedrigung der Oxalatausscheidung. Es wurde weder vor noch nach der Einnahme von Pyridoxin ein markanter Unterschied zwischen den Patienten und den gesunden Freiwilligen für die Ausscheidung an 4-PA gefunden. Ebenfalls kein signifikanter Wechsel wurde für die Glykolatausscheidung festgestellt. Unter der Pyridoxineinnahme kam es bei den gesunden Freiwilligen zu einer signifikanten Reduktion der Oxalatkonzentration im Plasma von  $2.3 \pm 0.37$  auf  $1.91 \pm 0.49 \mu\text{mol/l}$  ( $p = 0.008$ ). Die Patienten hingegen zeigten keine Änderung der Oxalatkonzentration im Plasma.

- In einer Studie wurden drei Fälle einer leichten metabolischen Hyperoxalurie mit Glykolaturie beschrieben [Gill 1986]. Jeder dieser drei Patienten zeigte ein anderes Verhalten auf Pyridoxin.

Ein Patient sprach bereits auf eine niedrige Dosis von 20mg/Tag an. Unter dieser Dosis kam es sowohl zu einer Normalisierung der Oxalat- als auch der Glykolatausscheidung. Nach einem Stopp der Pyridoxinbehandlung kam es zu einem erneuten Ansteigen dieser beiden Parameter. Ein zweiter Patient sprach zuerst auf eine niedrige Dosis an, wurde dann aber resistent. Der dritte Patient wiederum zeigte ein temporäres Ansprechen auf hohe Dosen. Die Autoren waren nicht fähig, andere Pyridoxinmangelsymptome auffindig zu machen als eine Hyperoxalurie und empfehlen dringend in allen Fällen einer Kalziumoxalaturolithiasis die Messung sowohl von Oxalat als auch von Glykolat im Urin.

- In einer Studie erhielten zwölf rezidivierende Steinpatienten mit einer Hyperoxalurie während einer Dauer von 180 Tagen Pyridoxinhydrochlorid (10mg/d) [Murthy 1982].

Der Pyridoxinstatus der Patienten, beurteilt durch den Erythrocyten-Transaminase-Aktivationsindex, verbesserte sich signifikant ( $p < 0.001$ ) nach der 180tägigen Supplementation verglichen mit den Ausgangswerten. Während sich die Urinoxalatausscheidung bis zum 90. Tag der Pyridoxintherapie signifikant erniedrigte ( $p < 0.05$ ), blieben andere Parameter wie z.B das Urinkalzium, -phosphat und -kreatinin unverändert. Signifikant positive Korrelationen wurden festgestellt zwischen der Erythrocyten-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EGPT) oder dem Erythrocyten-Glutamat-Oxalacetat-Trans-

aminase-Aktivationsindex und der Urinoxalatausscheidung ( $r=+0.78$ ,  $p<0.01$ ). Diese Befunde unterstreichen die Wichtigkeit von Vitamin B6 bei der Reduktion einer Hyperoxalurie. Während der Pyridoxintherapie sank die Urinoxalatausscheidung ohne signifikanten Wechsel in der Kalziumausscheidung. Der Kalzium/Oxalat-Quotient stieg so ständig und bildete eine Umgebung, wo keine signifikante Präzipitation von Kalziumoxalatkristallen möglich war. Diese Studie bestätigt die therapeutische Effizienz von Vitamin B6 zur Reduktion einer Hyperoxalurie selbst in niederen Dosen von 10mg pro Tag.

- In einer Studie wurden zwölf Patienten mit rezidivierenden, idiopathischen Kalziumoxalatsteinen mit Pyridoxin per os in einer Dosis von 300mg/Tag behandelt [Balcke 1983]. Vier dieser Patienten hatten zusätzlich eine Hyperkalziurie. Die Ausscheidung der Oxalsäure, Glykolsäure und von Kalzium im Urin wurde zu Beginn und nach sechs Wochen Pyridoxin gemessen. Innerhalb von sechs Wochen erniedrigte sich die tägliche Ausscheidung an Oxalsäure von  $480\pm122\mu\text{mol/Tag}$  auf  $336\pm83\mu\text{mol/Tag}$  ( $p<0.01$ ). Die Glykolsäureausscheidung fiel von  $208\pm51\mu\text{mol/Tag}$  auf  $153\pm26\mu\text{mol/Tag}$ . Die Urinkalziumausscheidung hingegen blieb unverändert. Die Autoren schliessen aus den Ergebnissen, dass die Reduktion der Oxalsäureausscheidung in der Prävention von idiopathischen Kalziumoxalatsteinen vorteilhaft ist.
- Mit zwei Gruppen von Patienten wurde eine klinische Studie durchgeführt, bei der alle Teilnehmer während zwei Monaten mit Pyridoxin per os (300mg/24h) behandelt wurden [Jaeger 1986]. Gruppe 1 bestand aus zehn idiopathischen Steinpatienten mit einer leichten Hyperoxalurie unbekannten Ursprungs. Gruppe 2 bestand aus vier Patienten mit einer absorptiven Hyperoxalurie nach einer intestinalen Bypassoperation. Es zeigte sich, dass im Mittel die absorptive Hyperoxalurie nicht beeinflusst wurde durch Pyridoxin, was vermuten lässt, dass diese Störung eher eine Konsequenz einer intestinalen Hyperabsorption von Oxalat als von Glyoxylat ist. Im Gegensatz dazu wurde die idiopathische Hyperoxalurie beeinflusst durch Pyridoxin; die Oxalatausscheidung im Urin erniedrigte sich bei acht von zehn Patienten und normalisierte sich bei sieben. Wie auch immer, zwei Patienten sprachen nicht auf Pyridoxin an; beide hatten als Begleitscheinung eine schwere Hyperurikosurie ( $>5950\mu\text{mol/24h}$ ), eine Beobachtung die vermuten lässt, dass in diesen zwei Fällen die Hyperoxalurie diätetischen Ursprungs ist. Vier der Patienten, deren Oxalatausscheidung sich unter Pyridoxin normalisierte, wurden während acht bis 36 Monate nach der Pyridoxintherapie weiterbeobachtet; in allen Patienten blieb die Oxalurie normal. Ein Patient, dessen Oxalurie erneut in den oberen Bereich der Norm anstieg, wurde nach zwei Jahren wieder mit Pyridoxin behandelt. Der Patient zeigte erneut einen Abfall der Oxalatausscheidung im Urin unter der Behandlung. Zusammenfassend stellten die Autoren fest, dass Pyridoxin bei Patienten mit einer idiopathischen Hyperoxalurie die Störung beheben kann, analog wie bei gewissen Fällen der primären Hyperoxalurie vom Typ I; das-

selbe ist bei der absorptiven Hyperoxalurie jedoch nicht der Fall.

### **3.4.3 Studien mit Vitamin-B6-Supplementation in Kombination mit Magnesiumoxid**

- In einer Studie erhielten 16 Patienten mit rezidivierenden Kalziumoxalatnierensteinen während 120 Tagen eine kombinierte Supplementation bestehend aus Magnesiumoxid (300mg/24h) und Pyridoxinhydrochlorid (10mg/24h) [Rattan 1994]. Die therapeutische Wirksamkeit wurde biochemisch durch die Messung verschiedener Parameter im Blut und im Urin evaluiert.  
Nach 30 Tagen unter der Behandlung stieg die Magnesiumkonzentration im Serum signifikant ( $p < 0.01$ ) und blieb danach konstant erhöht. Alle anderen Blutparameter blieben während der 120tägigen Behandlung unverändert. Die Kombination führte zu einem signifikanten Ansteigen der Magnesium- und Zitratausscheidung im Urin, während es bei der Oxalatausscheidung zu einen allmählichen, signifikanten Rückgang kam ( $p < 0.001$  nach 60 Tagen).
- In einer Studie wurden Patienten mit einer rezidivierenden Kalziumoxalatsteinbildung während längerer Zeit täglich mit oralen Dosen an Magnesiumoxid (200mg) und Pyridoxin (10mg) behandelt [Gershoff 1967].  
30 von 36 Patienten, die während fünf oder mehr Jahren an der Studie mitmachten, zeigten kein Rezidiv oder ein vermindertes Wiederauftreten einer Steinbildung. Nach einem Jahr unter der Kombinationsbehandlung zeigte der Urin von 51 Patienten ein markantes Ansteigen der Kapazität, Kalziumoxalat in Lösung halten zu können. Während im Urin die Kalziurie als auch die Zitraturie signifikant erhöht waren, wurden in der Ausscheidung von Magnesium, Oxalsäure, Phosphat oder Pyrophosphat keine signifikanten Veränderungen beobachtet.
- Durch die Kooperation von 64 Urologen, hauptsächlich aus dem Südosten der Vereinigten Staaten, konnten 149 sorgfältig selektionierte Privatpatienten mit einem rezidivierenden Kalziumoxalat- bzw. gemischten Kalziumoxalat/Kalziumphosphatnierensteinleiden studiert werden [Prien 1974]. Es handelte sich alles um Patienten mit einem idiopathischen Steinleiden, mit keiner feststellbaren metabolischen Abnormität, mit normalen Laborwerten und keinen Harnwegsinfektionen. Die Patienten erhielten während viereinhalb bis sechs Jahren täglich 300mg Magnesiumoxid und 10mg Pyridoxin.  
Die Steinproduktion verringerte sich im Mittel von 1.3 Steinen pro Patient und pro Jahr vor der Behandlung auf 0.10 Steine pro Patient und pro Jahr während der Behandlung. Die Studie zeigt, dass Magnesiumoxid und Pyridoxin in der verwendeten Dosis in der Rezidivprävention von idiopathischen Kalziumoxalatsteinen wirksam ist. Gemäss den Autoren war die "Kur" nicht nur zweckmässig sondern auch gut toleriert, preisgünstig und komplett harmlos.

### **3.4.4 Studien mit Vitamin-B6-Supplementation in Kombination mit mehreren Komponenten (Magurlit®)**

Für die Auflösung gemischter Steine wird ein Medikament benötigt, das aus mehreren Komponenten besteht [Balogh 1980]. Ein litholytischer Vertreter von diesem Typ ist Magurlit®.

Magurlit® Granulat (Chemical and Pharmaceutical Works Chinoin Ltd., Budapest) ist erhältlich in Kartons zu 200g aber auch in Dosen zu 2g [Baranyai 1980]. Die Zusammensetzung einer 2g Dosis ist folgendermassen: 0.79g Kaliumzitrat, 0.72g Natriumzitrat, 0.27g Zitronensäure, 0.18g Magnesiumzitrat, 0.01g Vitamin B6.

Bedingt durch seinen Magnesium- und Pyridoxingehalt verhindert es die Kalziumoxalatsteinbildung und durch Alkalisierung des Urins vermag es, Harnsäurekomponenten in Steinen aufzulösen [Balogh 1980]. Im Falle von Steinen, die für Röntgenstrahlen transparent sind und einem stabilen Urin-pH haben, kann Magurlit® erfolgreich zur Auflösung der Steine angewendet werden [Baranyai 1980]. Es kann dabei als Adjuvans verwendet werden, primär bei Patienten mit Uretersteinen. Die Grösse des Steins wird vermindert und ein spontanes Abgehen wird wahrscheinlicher. Im Falle von Steinen, die mässig röntgendicht sind (gemischte Steine) und ebenfalls einem stabilen Urin-pH haben, kann eine Magurlit®-Behandlung als konservative Methode angewendet werden. Magurlit® fördert die Ausscheidung von Harnsäuresand bzw. -gries und verhindert so die Bildung von Harnsäuresteinen. Allerdings sollte der Urin frei sein von Bakterien, und eine adequate Diurese sollte gewährleistet sein. Die unerwünschten Wirkungen sind gering und in den meisten Fällen von vorübergehendem Charakter [Baranyay 1979, Baranyai 1980]. Zudem zeigte sich, dass Magurlit von Patienten gut vertragen wird [Tóth 1979, Balogh 1980]. Es wird aber auch festgestellt, wie wichtig eine kontinuierliche Anwendung von Magurlit® und eine regelmässige Kontrolle der Patienten ist [Baranyai 1980]. Die Verschreibung von Magurlit® alleine genügt nicht für eine erfolgreiche Behandlung, selbst bei Vorhandensein einer Gebrauchsanweisung [Tóth 1979]. Ohne strikte Einhaltung, Konsultationen, Training und gründliche Kontrolle der Patienten konnte weder eine Auflösung der Steine noch eine Prävention der Steinbildung erreicht werden.

Eine klinische Studie mit 24 Patienten zeigte, dass Magurlit® zum Auflösen von reinen Harnsäuresteinen und solchen mit einem niedrigen Oxalatgehalt geeignet ist und ferner, dass es erfolgreich in der Prävention angewendet werden kann [Balogh 1980].

### **3.4.5 Zusammenhang zwischen der 4-Pyridoxinsäure und der Oxalatausscheidung**

- In einer Studie wurde bei 75 Nierensteinpatienten und bei 50 gesunden Freiwilligen unter ihrer gewohnten Diät die Ausscheidung der 4-PA und der Oxalsäure untersucht [Tiselius 1977a]. Die mittlere Ausscheidung der 4-PA betrug 0.85 bzw. 0.90 mg pro Tag und die mittlere Ausscheidung der Oxalsäure 27.5 bzw. 28.0 mg pro Tag. Statistisch wurde zwischen den beiden

Gruppen sowohl für die 4-PA als auch für die Oxalsäure kein Unterschied gefunden. Es wurde eine schwache, positive Korrelation zwischen der 4-PA- und der Oxalsäureausscheidung festgestellt. Patienten, die während der Urinsammlung unter einer Vitamin-C-Supplementation standen, schieden erhöhte Mengen an Oxalsäure aus.

Aus den Resultaten konnte gefolgert werden, dass die meisten Nierensteinpatienten eine 4-PA- und eine Oxalsäureausscheidung innerhalb der normalen Limiten aufwiesen. Niedrige 4-PA-Werte waren nicht mit einer hohen Ausscheidung an Oxalsäure kombiniert. Vom Vitamin-B6-Status der Nierensteinpatienten wurde angenommen, dass dieser ausreicht, um die endogene Oxalsäureproduktion kontrollieren zu können.

#### 4 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

---

Vitamin B6 ist in der belebten Natur weit verbreitet [Hartke 1986c]. In den Pflanzen entsteht es biosynthetisch, während Tiere es mit der Nahrung aufnehmen oder über die Darmflora bilden.

In der Natur kommen drei verschiedene Formen von Vitamin B6 vor, welche im Körper enzymatisch ineinander umgewandelt werden können und daher auch die gleiche Vitaminwirkung besitzen [Kieffer 1988].

Pyridoxin wird im Organismus durch Oxidation und Phosphorylierung in seine Wirkform Pyridoxal 5'-Phosphat überführt [Hartke 1986c]. Diese ist das Koenzym zahlreicher Enzyme, die Transaminierungen, Desaminierungen, Decarboxylierungen, Desulfhydrierungen sowie Spaltung und Synthese von Aminosäuren ermöglichen [Hartke 1986c, Morant 1994a]. Die meisten dieser Enzyme befinden sich in der Leber [Kieffer 1988]. Pyridoxin ist somit für den Eiweissstoffwechsel von zentraler Bedeutung und an der Synthese von Körpereiwiss, ferner an der Blutbildung, der Muskelfunktion und der Funktion des ZNS beteiligt [Hartke 1986c].

Eine Hyperoxalurie, wie sie bei einem Pyridoxinmangel beobachtet werden kann, entsteht (1.) aus einer erhöhten Oxalatbiosynthese, als Resultat einer reduzierten Transaminaseaktivität und einer erhöhten Aktivität von oxalatbiosynthetischen Enzymen (GAO und GAD) und (2.) aus einer erhöhten Absorption von diätetisch zugeführtem Oxalat [Nath 1990]. Um eine exzessive Oxalatproduktion aus Glyoxylat zu verhindern, wird das letztere enzymatisch in Glycin transaminiert [Jaeger 1992]. Für diese enzymatische Reaktion benötigt das Apoenzym allerdings Vitamin B6 [Jaeger 1992], welches als Kofaktor dient [Latta 1990, Milliner 1994, Sutton 1994] und somit die Oxalatproduktion durch Enzyminduktion reduzieren kann [Milliner 1994].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei idiopathischen Steinpatienten als auch bei experimentell induzierter Hyperoxalurie der Ratte zu einer Reduktion der Hyperoxalurie durch Pyridoxinsupplementation kam [Nath 1990]. Wird Pyridoxin bei idiopathischer Hyperoxalurie und primärer Hyperoxalurie vom Typ I verabreicht, so kann die Störung bei einem Teil



der Patienten korrigiert werden nicht jedoch bei der absorptiven Hyperoxalurie [Jaeger 1986].

## 4 PROJEKTE

### 4.1 Entwicklung einer Messmethode für Pyridoxal 5'-phosphat und 4-Pyridoxinsäure

#### 1 ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der letzten vier Dezennien wurden die verschiedensten Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Vitamin-B6-Metaboliten beschrieben. Nebst mikrobiologischen und enzymatischen Methoden sind auch zahlreiche chemisch-physikalische Methoden in der Literatur beschrieben.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die zur routinemässigen Erfassung des P5'P im Serum und der 4-PA im Urin geeignet ist. Es handelt sich um eine isokratische Methode mit nur einem Elutionsmittel sowie Verwendung von Fluoreszenzdetektion nach Post-Säulen-Derivatisierung mittels Natriumbisulfit. Die Selektivität der Methode ist hoch. Der Variationskoeffizient der Präzision für P5'P beträgt 3.6-6.0%, während der gleiche Koeffizient in der 4-PA zwischen 1.7-2.0% liegt. Für P5'P liegt der Variationskoeffizient der Reproduzierbarkeit je nach Konzentration zwischen 2.9-7.7%, während er für die 4-PA 6.3-6.9% beträgt. Die Recovery von P5'P beträgt je nach Zusatz 99-102%, und die Recovery von 4-PA liegt zwischen 97-101%.

Eine qualitative und quantitative HPLC-Bestimmungsmethode für das im Serum enthaltene P5'P und die mit dem 24h-Urin ausgeschiedene 4-PA konnte entwickelt werden unter Berücksichtigung von Sensitivität und Stabilität der Vitamere. Die Methode war einfach und praktisch in der Anwendung und kann anderen Labors empfohlen werden.

#### 2 EINLEITUNG

Die Trennung komplexer Substanzgemische ist ein zentrales Anliegen vieler spezieller Teildisziplinen in der Pharmazie [Hartke 1986a]. In der pharmazeutischen Analytik von Arzneimitteln bedingt eine Reihe technologisch erforderlicher Hilfsstoffe eine Abtrennung des oder der Arzneistoffe aus der Matrix des Arzneimittels. In der Pharmakokinetik sind Arzneistoffe und deren Metaboliten in einer komplexen Matrix körpereigener Substanzen (z.B. im Blutplasma) zu bestimmen. Schliesslich gilt es in der pharmazeutischen Biologie, definierte Inhaltsstoffe einer Droge aus der Vielzahl von Bestandteilen eines lebenden oder gar eines abgestorbenen Zellverbandes nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

Die analytischen Probleme, die mit der Bestimmung von Vitamin-B6-Vitaminen in biologischen Materialien assoziiert sind, sind vielfältig und wurden deshalb

schon seit Dekaden untersucht [Ubbink 1985]. Da Pyridoxal 5'-Phosphat (P5'P) die physiologisch aktive Form von Vitamin B6 darstellt [Hartke 1986c, Morant 1994], und seit P5'P-Messungen im Plasma einen guten Hinweis auf den Vitamin-B6-Ernährungszustand leisten, wurden für die Messung der B6-Vitamere verschiedene alternative Methoden entwickelt [Ubbink 1985].

Schon früh wurden spektrophotometrische [Gaudiano 1965, Nirmalchandar 1988] oder gaschromatographische Methoden [Korytnyk 1966, Williams 1974] zur Quantifizierung der B6-Vitamere entwickelt. Es wurden jedoch keine Bestimmungen mit Serum oder Plasma durchgeführt.

1967 wurde eine enzymatische Bestimmungsmethode durch Hamfelt beschrieben. Dabei wurde L-Tyrosin- $^{14}\text{C}$  (U) in Anwesenheit vom P5'P abhängigen Tyrosin-Decarboxylase Apoenzym umgewandelt in Tyramin- $^{14}\text{C}$  (U) +  $^{14}\text{CO}_2$  [Hamfelt 1967]. Die Methode wurde als spezifisch und sensitiv bezeichnet, benötigte pro Analyse allerdings 800  $\mu\text{l}$  Plasma, radioaktiv markiertes L-Tyrosin- $^{14}\text{C}$  und hatte eine mittlere Recovery von nur 88%. Eine analoge Methode wurde 1970 durch Chabner et al. beschrieben, wobei jedoch 900  $\mu\text{l}$  Plasma benötigt wurden [Chabner 1970].

Vereinzelte Autoren empfahlen auch die Dünnschichtchromatographie zur Trennung von verschiedenen Komponenten von Vitamin B6 [Dementjeva 1968, Ahrens 1969, Smith 1971].

1975 wurde ein System für eine semi-automatische Analyse von Pyridoxal, Pyridoxin und Pyridoxamin entwickelt [Yasumoto 1975]. Die entwickelte Methode erlaubte quantitative Messungen innerhalb von zwei Stunden und mit einer Präzision von  $100 \pm 4\%$ . Die Methode war jedoch hauptsächlich für quantitative Bestimmungen von pharmazeutischen Produkten mit Pyridoxin entwickelt worden und eignete sich für biologische Materialien nur beschränkt.

Die Lumineszenzeigenschaften von Pyridoxal und P5'P waren auch oft von Interesse und wurden bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht [Morozov 1967]. Dabei wurden verschiedene Fluoreszenz- und Absorptionsspektren aufgenommen. Aufgrund dieser Fluoreszenzeigenschaften konnten weitere Messmethoden entwickelt und beschrieben werden [Contractor 1968, Takanashi 1970a, Durkó 1973]. 1979 wurde eine Methode zur Bestimmung der 4-PA im Urin beschrieben [Gregory 1979]. Urinproben wurden mit Trichloressigsäure versetzt, um die Proteine auszufällen. Die Detektion erfolgte mittels eines Fluoreszenzdetektors unter isokratischen Bedingungen. 1981 wurde ein Assay zur quantitativen Bestimmung sämtlicher B6-Vitamere im Serum entwickelt, wobei dazu ein Spektrophotofluorometer verwendet wurde [Chauhan 1981]. Die Recovery aus dem Serum schwankte zwischen 90 und 93%.

1982 wurde der häufig zur Ermittlung des Vitamin-B6-Versorgungszustandes beim Menschen herangezogene Aktivierungskoeffizient der erythrozytären Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ( $\alpha$ -EGOT) konträr beurteilt [Leinert 1982]. Ergebnisse zeigten, dass eine einmalige Ermittlung des  $\alpha$ -EGOT-Wertes aufgrund der vielfältigen Beeinflussungsmöglichkeiten dieser Messgrösse als Beurteilungskriterium für den Vitamin-B6-Versorgungszustand wenig aussagefähig ist. Erst die Beobachtung der Veränderung des individuellen  $\alpha$ -Wertes bei

Mangel- und Substitutionsversuchen unter Berücksichtigung wesentlicher Einflussgrößen erlaubt eine fundierte Aussage. So wird z.B. die Maximalaktivität der EGOT durch das Alter der untersuchten Personen, eine unzureichende Proteinversorgung und chronischen Alkoholkonsum beeinflusst. Ein Jahr später wurde die Stimulation der Glutamat-Oxalacetat-Aminotransferase (EGOT) durch P5'P erneut vorgeschlagen [Vuilleumier 1983].

In den neunziger Jahren wurde immer mehr die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) empfohlen. 1981 wurde eine Extraktionsmethode für Plasma vorgestellt, die hilfreich ist für eine erfolgreiche Bestimmung der B6-Vitamerie mittels HPLC [Vanderslice 1981]. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines HPLC-Anionenaustauschsystems. Die Recovery für P5'P lag zwischen 87 und 98%. Die Methode benötigte allerdings 3ml Plasma und dauerte für eine Analyse 1.5 Stunden. 1989 wurde eine einfache HPLC-Methode vorgestellt, die die Messung aller sieben bekannten Formen von Vitamin B6 aus dem menschlichen Plasma nach Vitamin-B6-Supplementation erlaubte [Edwards 1989]. Für Urin- und Plasmabestimmungen mussten allerdings zwei verschiedene Elutionsmittel verwendet werden. Die Recovery aus dem Plasma betrug für P5'P im Mittel 92.5%.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der Druck angewandt wird [Rücker 1992]. Sie dient zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse. Bei der klassischen Säulenchromatographie fließt das Elutionsmittel aufgrund der Schwerkraft durch die mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule. Voraussetzung ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, die durch die Schwerkraft zustandekommt. Die Trennleistung der Säule hängt stark von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind, desto größer ist die Trennleistung. Aus kleineren Partikelgrößen resultiert aber eine wesentlich größere Packungsdichte in der Trennsäule. Um trotz der hohen Packungsdichte noch eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels zu gewährleisten, wird bei der HPLC das Elutionsmittel mit Hilfe von Pumpen durch die Säule gedrückt. Die Säulenchromatographie unter Druck kann unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden, so z.B. nach dem angewandten Trennverfahren (z.B. Ionenaustauschchromatographie), dem angewandten Druck (Nieder-, Mittel- und Hochdruckchromatographie) und/oder nach den durchgesetzten Substanzmengen (analytische und präparative Trennungen).

Das Ziel dieses Projektes war, eine qualitative und quantitative HPLC-Bestimmungsmethode für das im Serum enthaltene P5'P und die mit dem 24h-Urin ausgeschiedene 4-PA zu entwickeln. Berücksichtigt werden sollten nicht nur die Sensitivität sondern auch die Stabilität dieser beiden Vitamerie und die Einfachheit der Messmethode. Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die zur routinemässigen Erfassung des P5'P im Serum und der 4-PA im Urin geeignet ist.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

#### 3.1 STABILITÄT VON B6-VITAMEREN

Dem Erhalt der vollen Aktivität der beiden Vitamere P5'P und 4-PA und somit der Sicherstellung der Stabilität während dem ganzen Prozess, d.h. während der Probengewinnung, Lagerung, Verarbeitung und quantitativen Bestimmung, wurde eine hohe Priorität beigemessen.

Aus der Literatur sind Probleme mit der Stabilität bekannt und auch genauer untersucht worden. Während der Entwicklung von Vitamin-B6-Assays zeigte sich, dass Standardlösungen, aus mehreren Komponenten bestehend, sich zersetzen, während unter den gleichen Bedingungen die einzelnen Standardlösungen stabil blieben [Shephard 1986]. Alle Vitamine, mit Ausnahme von P5'P, waren stabil, wenn sie einzeln im Dunkeln gelagert wurden. Lösungen von P5'P waren stabil, wenn sie bei -20 °C eingefroren und bei einer Konzentration von 1mg/ml (pH 3.3) gelagert wurden. Wurde P5'P jedoch in Natriumacetatpuffer (pH 5.5) oder in destilliertem Wasser (pH 6.1) in einer Konzentration von 1µg/ml bei Raumtemperatur, im Dunkeln, während 24 Stunden gelagert, kam es zu einem 20% resp. 95% Verlust. Das Erscheinen eines Peaks im Chromatogramm, aufgrund der Retentionszeit als Pyridoxal identifiziert, liess vermuten, dass der Phosphatester (P5'P) unter diesen Bedingungen hydrolysiert wird. Wurde P5'P jedoch als 0.01 mol / l HCl hergestellt, war es für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur stabil. Ferner zeigte es sich, dass die einzelnen Standardlösungen bei -20 °C gelagert während Monaten stabil sind.

Bereits 1979 wurde die Stabilität von drei B6 Vitaminen unter verschiedenen Laborlichtbedingungen untersucht [Ang 1979]. Dabei zeigte sich, dass das normale Laborlicht sich am meisten destruktiv auf die Vitamere auswirkte, wobei die Destruktion bei hohem pH und langer Expositionszeit zunahm. Für die Bestimmung von P5'P und Pyridoxal im Plasma müssen dunkle Räume verfügbar sein, da diese beiden Vitamin-B6-Vitamere photosensitiv sind [Ubbink 1985].

P5'P kann durch Säurehydrolyse in Pyridoxal umgewandelt werden [Anderson 1974]. Kristallines Pyridoxal, alleine oder zum Serum hinzugefügt, war während der Säurehydrolyse hitzestabil. Pyridoxal, das aus der Konversion von kristallinem Pyridoxin entstanden ist, verhält sich gleich wie synthetisches Pyridoxal und ist hitzestabil [Davis 1974a]. Letzteres zeigte kein Absinken der Aktivität selbst nach einem 90minütigen Erhitzen bei 121 °C [Davis 1974b]. Im Serum hingegen gingen ca. 30% der Pyridoxalaktivität unter einem 45minütigen Erhitzen bei 121 °C verloren. Die restlichen 70% wiederum waren hitzestabil und zeigten keine Reduktion der Aktivität selbst nach einem weiteren 45minütigen Erhitzen.

Sämtliche Arbeiten im Labor, bei denen ein Vitamin-B6-Derivat direkt involviert war, wurden daher unter Lichtschutz, d.h. mit geschlossenen Sonnenstoren und ohne künstliches Licht, bei Raumtemperatur, durchgeführt.

#### 3.2 GERÄTE

Folgende Geräte wurden für Aufbereitung des Probenmaterials bzw. die Herstellung der Lösungen benötigt:

- Ein pH-Meter, Modell 940 Expandable Ionanalyzer (Orion Research AG, Küsnach, Schweiz)
- eine Analysenwaage, Modell Mettler AE 240S (Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz)
- eine Zentrifuge, Modell Megafuge 3.0R (Heraeus Sepatech GmbH, Zürich, Schweiz)
- eine Ultrazentrifuge, Modell Biofuge A (Heraeus-Christ GmbH, Zürich, Schweiz)
- ein Mixer, Modell K-550-GE (Haska AG, Bern, Schweiz)
- ein Magnetrührer, Modell IDA-COMBIMAG-RCH (Janke u. Kunkel JG, IKA Werk, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- ein Tiefgefrierschrank (-25 °C)
- ein Tiefgefrierschrank (-80 °C)

In Abbildung 5 ist der Aufbau des HPLC-Gerätes dargestellt.

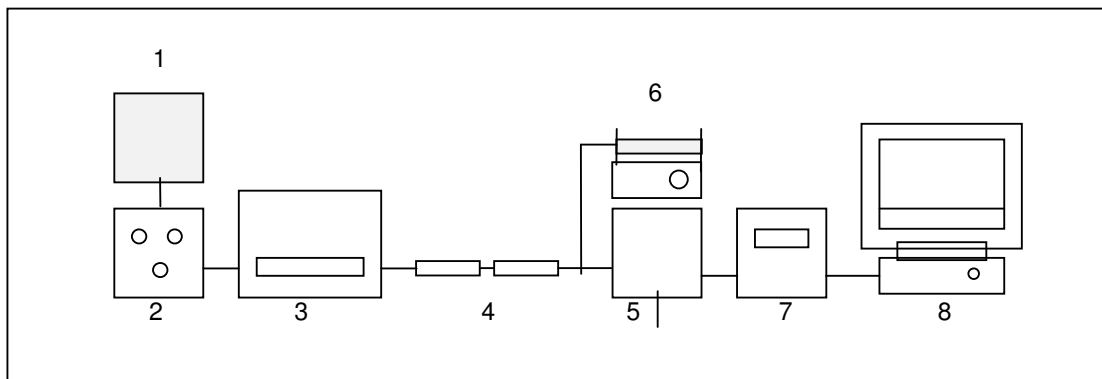


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des HPLC-Gerätes. 1: Reservoir des Elutionsmittels, 2: Hauptpumpe, 3: Probeneinlasssystem, 4: Trennsäulen, 5: Fluoreszenzdetektor, 6: Spritzenpumpe, 7: SIM-Box, 8: Computer

Die folgenden HPLC-Komponenten wurden für die Analyse benötigt:

- Eine Hauptpumpe, Modell Waters 510 Solvent Delivery System (Waters AG, Rapperswil, Schweiz), ausgelegt für eine isokratische Arbeitsweise
- ein automatisches Probeneinlasssystem, Modell Waters 712 WISP (Waters Intelligent Sample Processor), mit einem maximalen Injektionsvolumen von 200 µl
- eine SIM-Box, Modell Waters System Interface Modul, eine Einheit, welche den Datentransfer und die Befehlskontrolle zwischen dem Flüssigchromatographiesystem und dem Computer sicherstellt
- ein Fluoreszenzdetektor, Modell Waters 470 Scanning Fluorescence Detector, mit einer 150 Watt Xenonlampe
- eine Spritzenpumpe, Modell Perfusor<sup>®</sup> V (B. Braun Melsungen AG, Deutschland), für das Post-Säulen Reagens
- ein Computer, Modell Apciv, Power Mate 1, APC-H 202E (NEC, USA) mit

Bildschirm, Tastatur und Maus

- eine Computer-Software, Modell Maxima 820 Chromatography Software, Version 3.30 (1990) (Dynamic Solutions, Division of Millipore, Waters AG, Rapperswil, Schweiz)

### 3.3 TRENNSÄULEN

- Eine Vorsäule, Resolve C<sub>18</sub>, Partikelgrösse: 5µm, WATO46915 (Waters AG, Rapperswil, Schweiz), eingebettet in eine Kartusche, Universal Guard Column Holder, WATO46910, zur Schonung der nachfolgenden Trennsäulen vor Verschmutzung
- eine erste Trennsäule, Nova-Pak C<sub>18</sub>, Partikelgrösse: 4µm, 4.6mm x 250mm, WATO52840, eingebettet in eine Kartusche, End Connector Kit, WATO37525
- eine zweite Trennsäule, µBondapak C<sub>18</sub>, Partikelgrösse: 10µm, 3.9mm x 300mm, WATO27324
- zwei RCM 8x10 Module mit je einer µBondapak C<sub>18</sub>-Säule, Partikelgrösse: 10µm, 8mm x 100mm, WATO85721

### 3.4 REAGENTIEN UND CHEMIKALIEN

In Tabelle 4 sind die für die Analysen benötigten Reagentien und Chemikalien inklusive Lieferanten und Artikelnummern aufgeführt. Ebenfalls angegeben sind die beiden Standardsubstanzen P5'P und 4-PA, die für die Herstellung der Standardlösungen gebraucht wurden. In der nachfolgenden Liste sind die Adressen der Lieferanten aufgeführt.

Tabelle 4: Reagentien und Chemikalien

Bezeichnung	MW [g/mol]	CAS- bzw. EEC-Nr.	Lieferant	Artikel-Nr.
1-Hexansulfonsäure, Natriumsalz, Monohydrat	206.24	220-601-3	Fluka	52862
4-Pyridoxinsäure	183.2	82-82-6	Sigma	P-9630
Aqua ad Iniectionem		-	Inselspital-Apotheke	10022372
Dichlormethan	84.93	200-838-9	Merck	1.06054
Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	174.18	231-834-5	Merck	1.05104
Essigsäure 100% (Eisessig)	60.05	200-580-7	Merck	1.00063
Metaphosphorsäure	-	37267-86-0	Sigma	M-5043
ortho-Phosphorsäure 85%	98.0	231-633-2	Fluka	79617
Pyridoxal 5'-Phosphat	247.1	41468-25-1	Sigma	P-9255
Natriumbisulfit	-	7631-90-5	Sigma	S-9000
Stickstoff N <sub>2</sub> , verdichtet, 200 bar	-	231-783-9	Carbagas	1066

Fortsetzung:

Bezeichnung	MW [g/mol]	CAS- bzw. EEC-Nr.	Lieferant	Artikel-Nr.
Triethylamin 99%	101.2	204-469-4	Sigma	T-0886

Adresse der Lieferanten:

- Carbagas, Bern-Liebefeld, Schweiz
- Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Inselspital-Apotheke, Inselspital, Bern, Schweiz
- Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

### **3.5 LÖSUNGSMITTEL**

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine extrem empfindliche Methode, weshalb an die verwendeten Lösungsmittel sehr hohe Reinheitsanforderungen zu stellen sind [Hartke 1986b]. Aus dem gleichen Grund wurde der Nullabgleich des Messsystems immer mit dem auch bei der Analyse verwendeten Lösungsmittel durchgeführt.

#### **3.5.1 Elutionsmittel**

10ml Essigsäure 100% wurden mit 900ml Aqua ad Iniectionabilia verdünnt, mit Triethylamin auf einen pH von 3.20 eingestellt und mit Aqua ad Iniectionabilia auf 1000ml ergänzt. Der Lösung wurden 825mg Hexansulfonsäure hinzugefügt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die Lösung unter Verwendung einer engporigen Filternutsche filtriert (Millipore Filter, Typ GV, 0.22µm, Waters AG, Rupperswil, Schweiz).

#### **3.5.2 Post-Säulen-Puffer**

122g wasserfreies  $K_2HPO_4$  wurden in Aqua ad Iniectionabilia gelöst und auf ein Volumen von 200ml ergänzt. Durch Hinzufügen von 3.5 N  $H_3PO_4$  (80ml konzentrierte  $H_3PO_4$  mit Aqua ad Iniectionabilia auf 1000ml ergänzt) wurde die Lösung auf einen pH von 7.80 eingestellt.

#### **3.5.3 Post-Säulen-Lösung**

300mg  $NaHSO_3$  wurden in Post-Säulen-Puffer gelöst und auf 100ml ergänzt.

#### **3.5.4 Standardlösungen**

Von P5'P wurden Standardlösungen mit einer Konzentration von 5ng/µl und von 4-PA Standardlösungen mit einer Konzentration von 1ng/µl hergestellt. Als Lösungsmittel diente in beiden Fällen 10% Essigsäure. Die Standardlösungen wurden halbjährlich neu hergestellt und sofort eingefroren (-20°C).

#### **3.5.5 Interner Standard**

Es wurde kein interner Standard, wie z.B. 3,5-Diaminobenzoessäure [Mahuren



1990] oder 2-Amino-5-Chlorbenzoesäure [Coburn 1983] verwendet, da in jedem Assay eine Standardreihe, unter den gleichen Bedingungen wie die Analysen, mitbestimmt wurde.

### **3.5.6 Weitere Lösungen**

- Metaphosphorsäure 10%: 5.0g Metaphosphorsäure wurden in Aqua ad Iniectabilia gelöst und auf 50.0ml ergänzt.
- Essigsäure 10%: 10ml Essigsäure 100% wurden mit Aqua ad Iniectabilia auf 100ml ergänzt.

## **3.6 DURCHFÜHRUNG EINER ANALYSE**

Die Säulen wurden jeweils am Tag vor der Analyse zusammengebaut und während der nachfolgenden Nacht mit Aqua ad Iniectabilia gespült, um Verunreinigungen, Kristalle und Luftblasen zu entfernen. Vor der Analyse wurde das System mit dem Elutionsmittel bis zum Erreichen einer stabilen Baseline durchspült. Nach Beendigung der Analyse wurde wiederum eine Nacht lang mit Aqua ad Iniectabilia gespült, um das Elutionsmittel zu entfernen sowie ein Auskristallisieren zu verhindern.

### **3.6.1 P5'P**

Es wurden sämtliche fünf Säulen in der oben angegebenen Reihenfolge benötigt. Die Flussrate der Hauptpumpe betrug 0.9ml/min, diejenige der Spritzenpumpe 1.2ml/h. Das Injektionsvolumen betrug 100µl. Eine vollständige Analyse war innert 60 Minuten durchführbar.

### **3.6.2 4-PA basal**

Es wurden nur die ersten drei Säulen benötigt. Die Flussrate der Hauptpumpe betrug 1ml/min, diejenige der Spritzenpumpe 1.2ml/h. Das Injektionsvolumen betrug 40µl. Eine vollständige Analyse war innert 30 Minuten durchführbar.

### **3.6.3 4-PA nach Vitamin-B6-Belastung**

Es wurde nur die Vorsäule benötigt. Die Flussrate der Hauptpumpe betrug 1ml/min, diejenige der Spritzenpumpe 1.2ml/h. Das Injektionsvolumen betrug 20µl. Eine vollständige Analyse war innert 2 Minuten durchführbar.

## **3.7 MATERIALZUBEREITUNG**

### **3.7.1 P5'P**

Gefrorenes Serum wurde in einem Wasserbad aufgetaut, auf Raumtemperatur erwärmt und während einer Minute gemixt. 400µl Serum wurde in einem Polystyrolröhrchen mit 400µl Metaphosphorsäure 10% versetzt, während einer Minute gemixt und anschliessend während 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. 500µl vom Überstand wurde in einem Polypropylenröhrchen mit 500µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt, während einer Minute gemixt und anschliessend während 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. 400µl vom Überstand wurde in einem Eppendorfröhrchen während 15 Minuten mit 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand war direkt einspritzbar.

### **3.7.2 4-PA basal**

Gefrorener 24h-Urin wurde in einem Wasserbad aufgetaut, auf Raumtemperatur erwärmt und während einer Minute gemixt. 100µl Urin wurde in einem Polystyrolröhrchen mit 900µl Essigsäure 10% versetzt und während einer Minute gemixt. 100µl davon wurde in einem Polystyrolröhrchen mit 400µl Essigsäure 10% versetzt und während einer Minute gemixt. Es resultierte eine 50fache Verdünnung des Urins, welche direkt einspritzbar war.

### **3.7.3 4-PA nach Vitamin-B6-Belastung**

Gefrorener 24h-Urin wurde in einem Wasserbad aufgetaut, auf Raumtemperatur erwärmt und während einer Minute gemixt. 100µl Urin wurde in einem Polystyrolröhrchen mit 3900µl Essigsäure 10% versetzt und während einer Minute gemixt. 40µl davon wurde in einem Polystyrolröhrchen mit 1460µl Essigsäure 10% versetzt und während einer Minute gemixt. Es resultierte eine 1500fache Verdünnung des Urins, welche direkt einspritzbar war.

## **3.8 HERSTELLUNG EINER STANDARDREIHE**

### **3.8.1 P5'P**

Die Standards wurden mit Sammelserum von gesunden Freiwilligen hergestellt. Gefrorenes Serum wurde in einem Wasserbad aufgetaut, auf Raumtemperatur erwärmt und während einer Minute gemixt. Es wurden 5 Polystyrolröhrchen mit je 400µl Serum vorgelegt, aus denen unterschiedliche Volumina Serum gemäss der Tabelle 5 entnommen und durch das gleiche Volumen P5'P-Standardlösung ergänzt wurden.

Tabelle 5: Herstellung von P5'P-Standards

Bezeichnung der Standards	Entnommenes und durch P5'P-Standardlösung ergänztes Volumen
Ausgangswert	0µl/400µl Serum
Standard 1	3µl/400µl Serum
Standard 2	6µl/400µl Serum
Standard 3	9µl/400µl Serum
Standard 4	12µl/400µl Serum

Die Standards wurden mit 400µl Metaphosphorsäure 10% versetzt und weiterbehandelt wie normale Seren.

### **3.8.2 4-PA**

Die Standards wurden direkt in Polystyrolröhrchen mit Essigsäure 10% gemäss der Tabelle 6 hergestellt.

Tabelle 6: Herstellung von 4-PA-Standards

Bezeichnung der Standards	Volumen der Standardlösung in 2000µl Essigsäure 10%
Ausgangswert	0µl /2000µl
Standard 1	10µl /2000µl
Standard 2	20µl /2000µl
Standard 3	40µl /2000µl
Standard 4	80µl /2000µl

Die so erhaltenen Standards waren direkt einspritzbar.

### 3.9 LINEARITÄT DER STANDARDKURVE

Die Linearität der Standardkurve wurde in jedem Assay mittels linearer Regression überprüft. Messpunkte von Proben, die sich ausserhalb des linearen Bereichs der Standardkurve befanden, wurden nicht berücksichtigt und wurden zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Betroffen davon war v.a. die 4-PA im Urin, in seltenen Fällen das P5'P nach Vitamin-B6-Belastung. Durch eine genügend grosse Verdünnung des Urins konnten diese Ausfälle jedoch vermieden werden.

### 3.10 BERECHNUNG DER KONZENTRATION

In das Fluoreszenzspektrum gehen unmittelbar die spektralen Eigenschaften der verwendeten Strahlungsquellen, Monochromatoren und des Empfängers ein [Hartke 1986b]. Es ist folglich im Gegensatz zur Absorptionsphotometrie in Lösung nicht ohne weiteres möglich, Absolutmessungen durchzuführen. PH. EUR. schreibt deshalb grundsätzlich die relative Messung gegen eine Referenzsubstanz oder einen anderen vorgegebenen Standard vor.

Aus diesem Grund erfolgte die Berechnung der Konzentration an P5'P bzw. 4-PA auch in dieser Methode mit Hilfe von Standards. Dabei wurden die Peak-Höhen x der Chromatogramme mittels linearer Regression mit den bekannten Konzentrationen y der Standards korreliert. Es gilt:

$$y = ax + b$$

Mit den Parametern a, b und zusammen mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor konnten die Konzentrationen der zu analysierenden Lösungen errechnet werden.

### 3.11 VERIFIZIERUNG DER PEAK-IDENTITÄT

Die Peakidentität wurde sichergestellt durch (1.) die Verwendung der optimalen Wellenlängen sowie (2.) die Retentionszeit des jeweiligen Vitamers.

### 3.12 BESTIMMUNG DER OPTIMALEN WELLENLÄNGEN

Die Fluoreszenzintensität ist abhängig vom pH [Bridges 1966, Takanashi 1970a] und der Molekülstruktur [Bridges 1966]. Zudem besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Intensität der Fluoreszenz und der Konzentration der zu bestimmenden Substanz nur dann, wenn die Anregungs- und Fluoreszenzwellenlängen weit genug auseinanderliegen, d.h. wenn keine Reabsorption eintreten kann [Hartke 1986b].

Da von dieser Methode die Erreger- und Emissionswellenlängen nicht bekannt waren, mussten die optimalen Wellenlängen zuerst im einem Test unter Analysenbedingungen bestimmt werden. Gesucht werden musste diejenige Emissionswellenlänge, bei konstanter Erregerwellenlänge, bei der die Fluoreszenzintensität am grössem ist und umgekehrt. Vor jedem Assay wurden die beiden Wellenlängen zudem erneut auf ihre Richtigkeit überprüft.

### 3.13 PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Die Präzision (Intra-Assay Varianz) wurde durch wiederholtes Bestimmen von verschiedenen Serum- bzw. Urinproben in einem einzigen Assay berechnet. Bei den Serumproben wurden zwei Seren unterschiedlicher Konzentration, ein basales Serum sowie ein Serum nach Vitamin-B6-Belastung, verwendet. Bei den Urinproben handelte es sich um zwei mit 5mM Essigsäure verdünnte 24h-Urine unterschiedlicher Konzentration.

Die Reproduzierbarkeit (Inter-Assay Varianz) wurde von den erzielten Daten zweier Kontrollserumpools bzw. zweier Kontrollurin pools errechnet, die über eine Dauer von zwei Monaten hinweg geprüft wurden.

### 3.14 RECOVERY - WIEDERFINDUNG

Für die Recovery von Seren wurden unterschiedliche Mengen an P5'P einem basalen Serumpool beigefügt. Die Serumproben wurden vor und nach dem Zusatz in einem einzigen Assay analysiert.

Für die Recovery von 24h-Urinen wurden unterschiedliche Mengen an 4-PA einem mit 5mM Essigsäure verdünnten, basalen Urinpool beigefügt. Die Urinproben wurden vor und nach dem Zusatz je sieben Mal, in einem einzigen Assay, analysiert.

## 4 ERGEBNISSE

In Abbildung 6 ist ein typisches Chromatogramm von P5'P im Serum und in Abbildung 7 das Chromatogramm der 4-PA aus verdünntem 24h-Urin dargestellt. Während im Urin mit dieser Verdünnung nur ein einziger Peak, die 4-PA, erkennbar war, waren auf dem Serumchromatogramm mehrere Peaks erkennbar, die jedoch alle von P5'P ( $t_R=12.21\text{min.}$ ) deutlich abgetrennt waren; der auf P5'P nachfolgende Peak ( $t_R=14.13\text{min.}$ ) folgte erst in einem Abstand von knapp 2 Minuten.

In Abbildung 8 ist das Fluoreszenzspektrum von P5'P und in Abbildung 9 dasjenige von 4-PA dargestellt. Durch die Aufnahme dieser beiden Spektren konn-

ten die Wellenlängen mit der grössten Peak-Höhe festgestellt werden. Für P5'P betrug in diesem Assay die optimale Emissionswellenlänge 402nm und die optimale Erregerwellenlänge 328nm. Für die 4-PA hingegen lagen die optimalen Wellenlängen im untersuchten Assay bei 430nm resp. 314nm.

Die Präzision wurde durch wiederholtes Bestimmen von Serum- bzw. Urinproben in einem einzigen Assay berechnet. In Tabelle 7 sind die Variationskoeffizienten von P5'P und von der 4-PA dargestellt. Bei den Serumproben wurden zwei Seren unterschiedlicher Konzentration, ein basales Serum sowie ein Serum nach Vitamin-B6-Belastung, verwendet. Bei den Urinproben handelte es sich um zwei mit 5mM Essigsäure 50fach verdünnte 24h-Urine unterschiedlicher Konzentration. Wie aus Tabelle 7 erkennbar ist, betrug der Variationskoeffizient für P5'P 3.6-6.0%, während der gleiche Koeffizient in der 4-PA zwischen 1.7-2.0% lag.

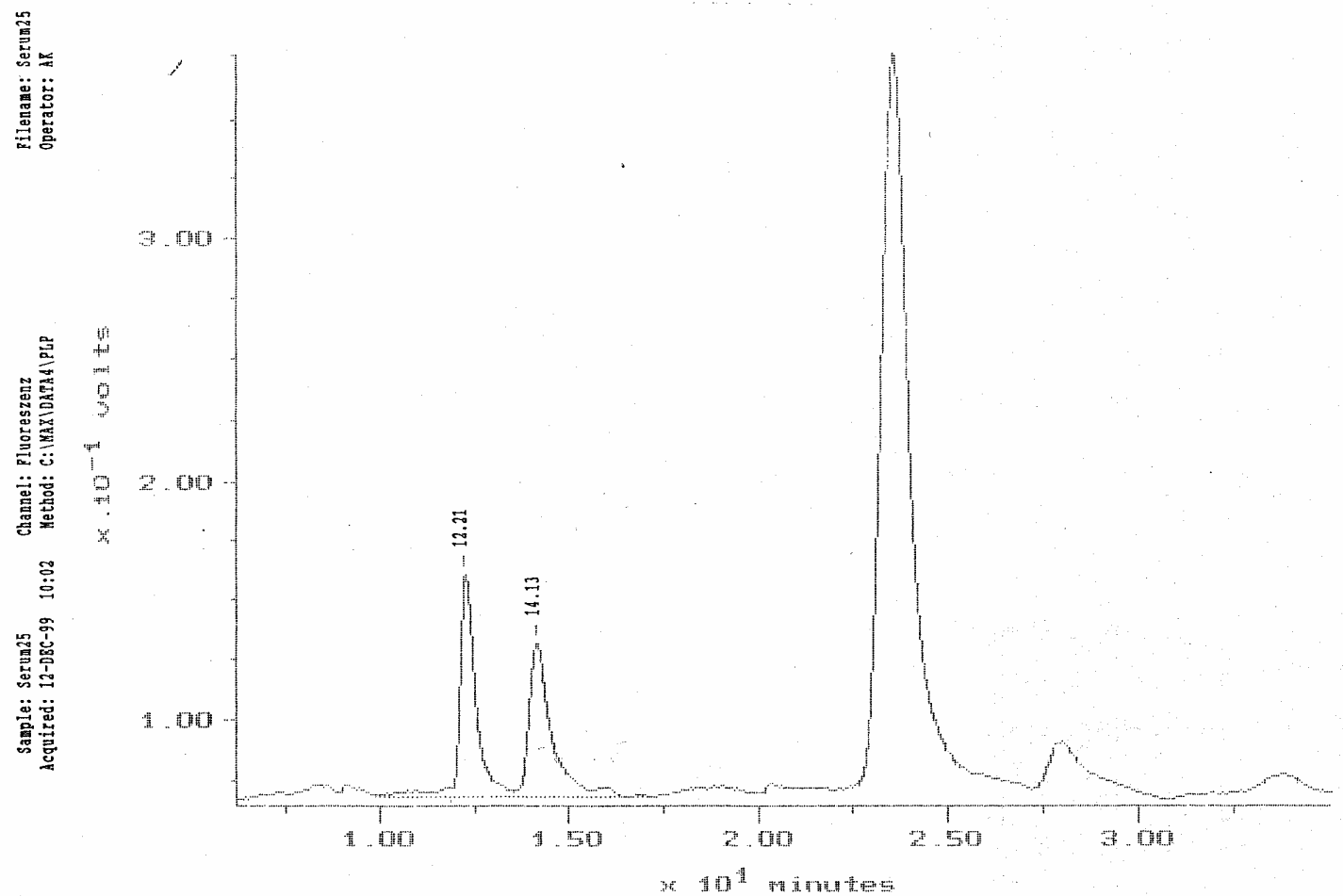


Abbildung 6: Chromatogramm des P5'P im Serum

Die Retentionszeit des P5'P betrug 12.21 Minuten, die Peak-Höhe 94'977 Einheiten und die dadurch berechnete Konzentration 119.2pg/ $\mu$ l. Die Analyse wurde gemäss Kapitel 3.6 durchgeführt ( $v_E=0.9$ ml/min,  $v_D=1.2$ ml/h,  $v_I=100\mu$ l).

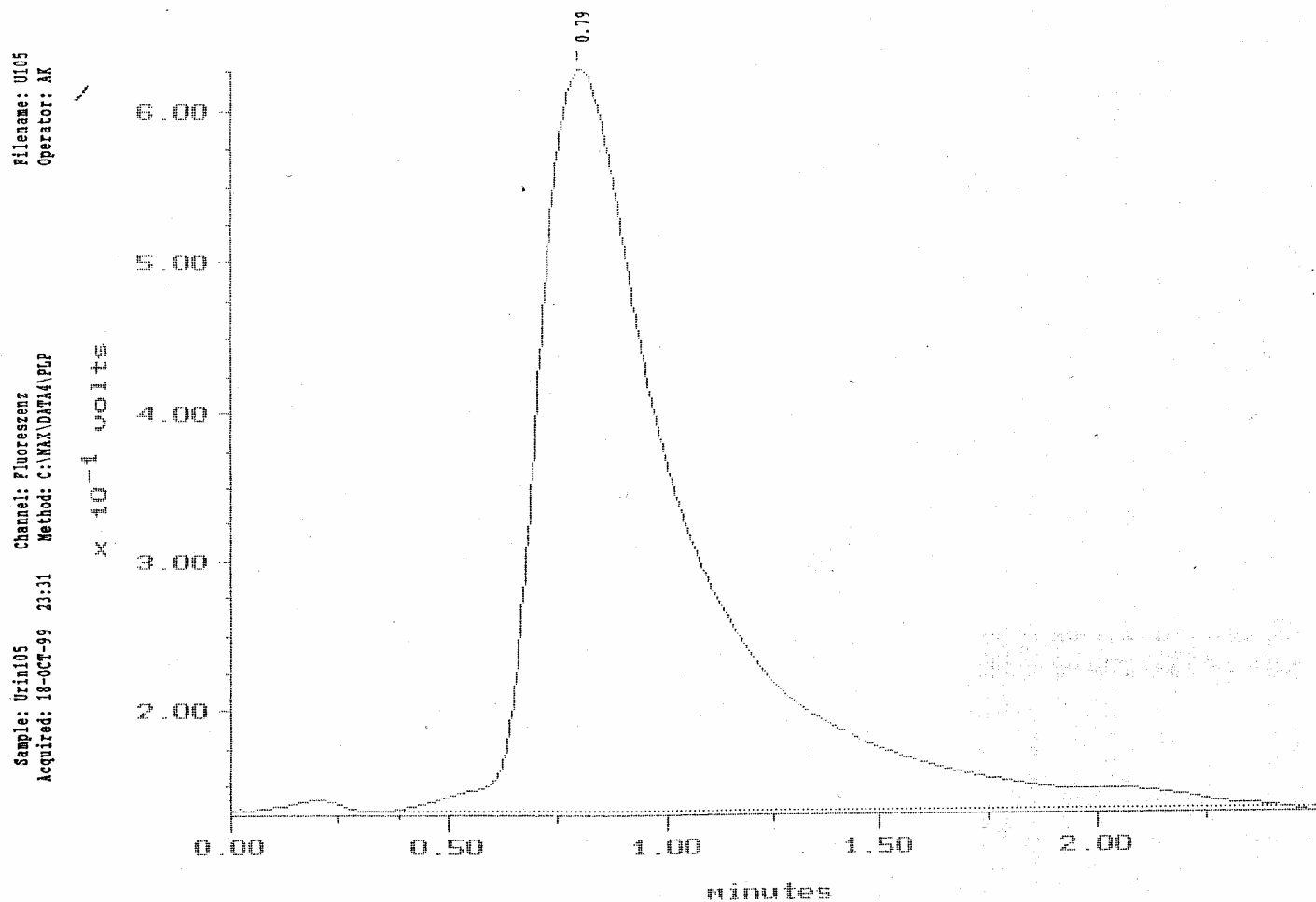


Abbildung 7: Chromatogramm der 4-PA im 24h-Urin

Die Retentionszeit der 4-PA betrug 0.793 Minuten, die Peak-Höhe 492'814 Einheiten und die dadurch berechnete Konzentration 72.1pg/ $\mu$ l. Die Analyse wurde gemäss Kapitel 3.6 durchgeführt ( $v_E$ =1.0ml/min,  $v_D$ =1.2ml/h,  $v_I$ =20 $\mu$ l).

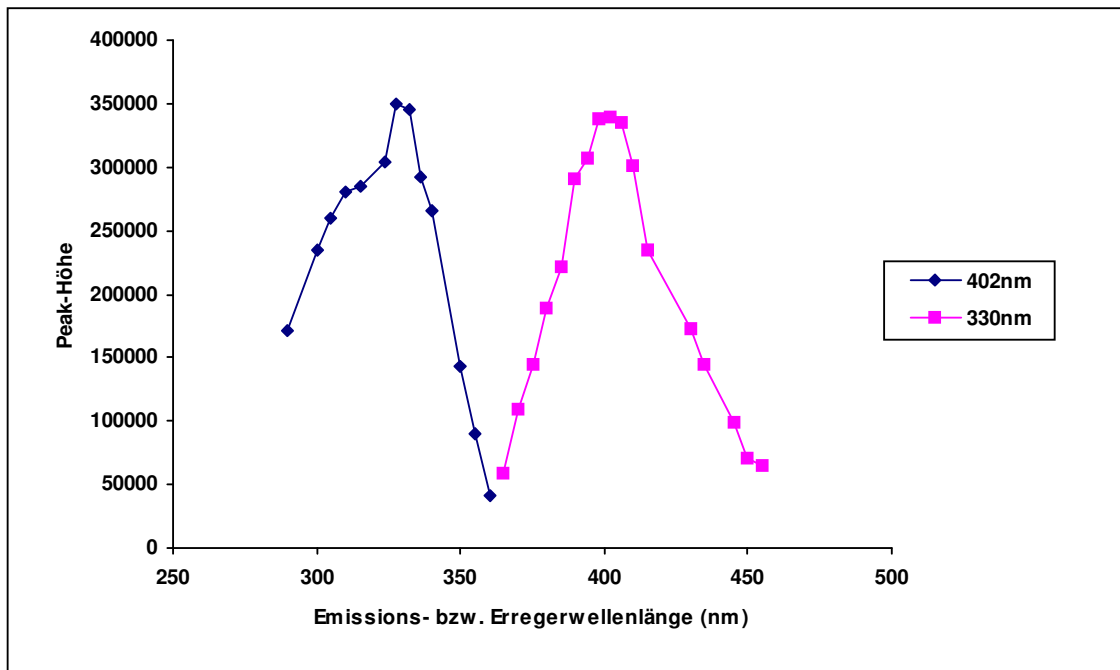


Abbildung 8: Fluoreszenzspektrum von P5'P

Durchgeführt mit einer Standardlösung (conc.=125pg/μl), einem Output-pH von 4.26 und einer Vorsäule ( $v_E=1.0\text{ml/min}$ ,  $v_D=1.2\text{ml/h}$ ,  $v_I=80\mu\text{l}$ ,  $t_R=1.5\text{min}$ ,  $p=110$ ) bei einer konstanten Erregerwellenlänge von 330nm bzw. einer konstanten Emissionswellenlänge von 402nm.

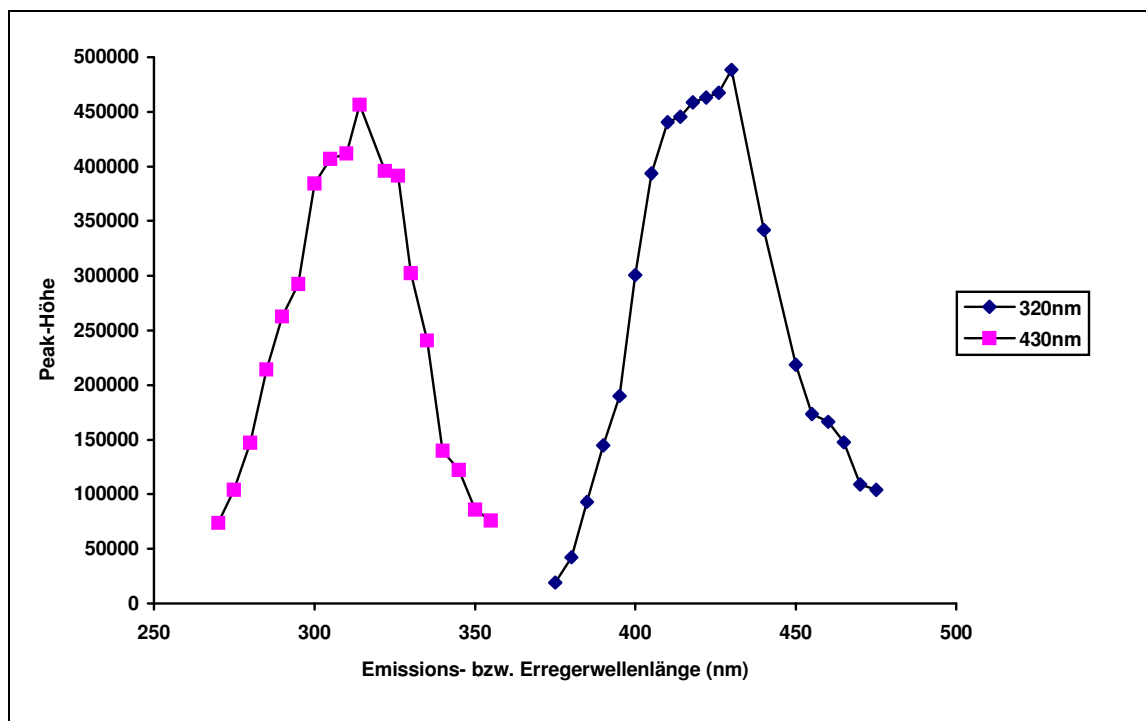


Abbildung 9: Fluoreszenzspektrum von 4-PA



Durchgeführt mit einer Standardlösung (conc.=37.8pg/μl), einem Output-pH von 4.26 und einer Vorsäule ( $v_E=1.0\text{ml/min}$ ,  $v_D=1.2\text{ml/h}$ ,  $v_I=20\mu\text{l}$ ,  $t_R=1.5\text{min}$ ,  $p=110$ ) bei einer konstanten Erregerwellenlänge von 320nm bzw. einer konstanten Emissionswellenlänge von 430nm.

Tabelle 7: Intra-Assay Varianz

Vitamer	Durchschnittswert <sup>a</sup> (pg/μl)	N	Variationskoeffizient (%)
P5'P	22.2 ± 1.3	3	6.0
P5'P	118 ± 4	6	3.6
4-PA	5.57 ± 0.11	7	2.0
4-PA	37.2 ± 0.6	5 <sup>b</sup>	1.7

<sup>a</sup>Mittelwert ± Standardabweichung. <sup>b</sup>Von 7 Messungen konnten nur 5 ausgewertet werden, da sich 2 ausserhalb des linearen Bereichs befanden.

Die Reproduzierbarkeit wurde von den erzielten Daten zweier Kontrollserumpools bzw. zweier Kontrollurinpoolen errechnet, die über eine Dauer von zwei Monaten hinweg geprüft wurden. In Tabelle 8 sind die Variationskoeffizienten von P5'P und von der 4-PA dargestellt. Für P5'P lag er je nach Konzentration zwischen 2.9-7.7%, während der Variationskoeffizient für die 4-PA 6.3-6.9% betrug.

Tabelle 8: Inter-Assay Varianz

Vitamer	Durchschnittswert <sup>a</sup> (pg/μl)	N	Variationskoeffizient (%)
P5'P	22.4 ± 1.7	6	7.7
P5'P	106 ± 3	6	2.9
4-PA	11.5 ± 0.8	6	6.9
4-PA	34.2 ± 2.2	6	6.3

<sup>a</sup>Mittelwert ± Standardabweichung

Die Recovery (Wiederfindung) von P5'P ist in Tabelle 9 dargestellt und betrug je nach Zusatz zwischen 99 und 102%. Tabelle 10 zeigt die Recovery von 4-PA, welche zwischen 97-101% lag.

Tabelle 9: Recovery von P5'P

1000µl Sammelserum wurden 5, 10 bzw. 20µl Serum entnommen und durch das gleiche Volumen Standardlösung (conc.=5000pg/µl) ersetzt. Die Analyse wurde in einem einzigen Assay durchgeführt.

P5'P im Serum (pg/1000µl) <sup>a</sup>	P5'P entnommen (pg)	P5'P hinzugefügt (pg)	Erwartete Werte (pg/1000µl)	P5'P gefunden (pg/1000µl) <sup>b</sup>	Recovery (%)
22165 ± 1324	111	25000	47054	48219 ± 2026	102
22165 ± 1324	222	50000	71943	70993 ± 3781	99
22165 ± 1324	443	100000	121722	123541 ± 4169	102

<sup>a</sup>Mittelwert ± Standardabweichung 3fach analysiert. <sup>b</sup>Mittelwert ± Standardabweichung 6fach analysiert.

Tabelle 10: Recovery von 4-PA

Einem mit 5mM Essigsäure, 50fach verdünnten, basalen Urinpool von 2000µl wurden 10, 20, 40 bzw. 60µl Urin entnommen und durch das gleiche Volumen Standardlösung (conc.=944pg/µl) ersetzt. Die Analyse wurde in einem einzigen Assay durchgeführt.

4-PA im Urinpool (pg/µl) <sup>a</sup>	4-PA entnommen (pg)	4-PA hinzugefügt (pg)	Erwartete Werte (pg/µl)	4-PA gefunden (pg/µl) <sup>a</sup>	Recovery (%)
5.57 ± 0.11	56	9440	10.26	10.40 ± 0.12	101
5.57 ± 0.11	111	18880	14.95	15.12 ± 0.47	101
5.57 ± 0.11	223	37760	24.34	24.37 ± 0.55	100
5.57 ± 0.11	334	56640	33.72	32.63 ± 0.57	97

<sup>a</sup>Mittelwert ± Standardabweichung 7fach analysiert.

## 5 DISKUSSION

Das Ziel dieses Projektes war, mit Hilfe des im Labor vorhandenen HPLC-Gerätes, eine qualitative und quantitative Bestimmungsmethode für das im Serum enthaltene P5'P und die mit dem 24h-Urin ausgeschiedene 4-PA zu entwickeln. Berücksichtigt werden sollten nicht nur die Sensitivität sondern auch Stabilität dieser beiden Vitamere und die Einfachheit der Messmethode.

Innerhalb der letzten vier Dezennien wurden die verschiedensten Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Vitamin-B6-Metaboliten beschrieben. Neben der Bestimmung des Vitamin-B6-Gehaltes im Serum oder in Blutzellen bot sich als weiterer direkter Parameter für den Versorgungszustand die Ermittlung der Vitamin-B6-Ausscheidung bzw. seiner Metabolite im Harn,

speziell der 4-PA, an [Simon 1982]. Viele der dafür entwickelten Methoden hatten aber auch ihre Schwächen: Zahlreiche Methoden eigneten sich nicht für die Anwendung an biologischen Materialien, wurden nicht damit geprüft [Gaudiano 1965, Korytnyk 1966, Ahrens 1969, Williams 1974, Reitzer-Bergaentzle 1993] oder eigneten sich nur für Arzneistoffe [Yasumoto 1975, Williams 1975]. In anderen Methoden mussten radioaktiv markierte Marker verwendet werden [Hamfelt 1967, Chabner 1970, Thanassi 1980], verbunden mit den entsprechenden Problemen des Strahlenschutzes in Handhabung, Transport, Lagerung und Entsorgung. Auch wurden verschiedene Methoden, wie z.B. die Verwendung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, in der Literatur konträr beurteilt [Leinert 1982] und ein Jahr später wieder empfohlen [Vuilleumier 1983].

Die Bestimmung der B6-Vitamerie mittels HPLC, wie in dieser Arbeit beschrieben, ist nicht neu. 1990 wurde eine hoch-sensitive HPLC Methode zur P5'P-Bestimmung empfohlen [Hirose 1990]. Bei dieser Methode wurde allerdings ein Plasmaextrakt mit Kaliumcyanid versetzt, um P5'P zu Pyridoxinsäure-5'-Phosphat zu oxidieren und als solches auch zu messen. Die heutige Verwendung von Cyaniden im Labor ist allerdings nicht unbedenklich und sollte deshalb nach Möglichkeiten vermieden werden.

1992 wurde zur Bestimmung der B6-Vitamerie eine sensitive Mikromethode mittels HPLC, Fluoreszenzdetektion und Postsäulen-Derivatisierung mit Natriumbisulfit verwendet [Sharma 1992]. Dabei wurden Metaphosphorsäure-Extrakte zusammen mit einem Internen Standard ins HPLC-System injiziert. Es wurde eine binäre Gradientenelution mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.2ml/min. durchgeführt. Es wurden zwei Säulen verwendet, eine 30mm Vorsäule und eine 150mm Trennsäule. Die Assaydauer betrug inklusive Säulenequilibration 35 Minuten. Die Recovery für P5'P im Plasma betrug  $90 \pm 22\%$ . Die Durchführung einer binären Gradientenelution ist aufwendig und die Anwendung gerätetechnisch nicht in jedem Labor durchführbar.

In zahlreichen Methoden liess auch die Recovery zu wünschen übrig [Sharma 1992, Driskell 1991, Reitzer-Bergaentzle 1993].

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode beschrieben werden, die zur routinemässigen Erfassung des P5'P im Serum und der 4-PA im Urin geeignet ist. In den Chromatogrammen waren die Peaks von P5'P und von der 4-PA deutlich abgetrennt. Durch die Aufnahme von Fluoreszenzspektren vor jedem Assay konnten die Wellenlängen mit der grössten Peak-Höhe festgestellt werden und so zur Selektivität der Methode beitragen. Die Präzision wurde durch wiederholtes Bestimmen von Serum- bzw. Urinproben in einem einzigen Assay berechnet. Der Variationskoeffizient für P5'P betrug 3.6-6.0%, während der gleiche Koeffizient für die 4-PA zwischen 1.7-2.0% lag. Die Reproduzierbarkeit wurde aus den erzielten Daten zweier Kontrollserumpools bzw. zweier Kontrollurin pools errechnet, die über eine Dauer von zwei Monaten hinweg geprüft wurden. Für P5'P lag der Variationskoeffizient je nach Konzentration zwischen 2.9-7.7%, während er für die 4-PA 6.3-6.9% betrug. Die Recovery für P5'P betrug je nach Zusatz 99-102%, und die Recovery für die 4-PA lag zwischen 97-101%. Die Retentionszeiten innerhalb eines Assays blieben in der Regel kon-

stant, vorausgesetzt kein beteiligter Parameter wurde in irgendeiner Art und Weise verändert. Ferner konnte durch korrekte Lagerung und Handhabung der Proben die Stabilität gewährleistet werden.

Mit Hilfe des im Labor vorhandenen HPLC-Gerätes konnte eine qualitative und quantitative Bestimmungsmethode für das im Serum enthaltene P5'P und die mit dem 24h-Urin ausgeschiedene 4-PA entwickelt werden unter Berücksichtigung von Sensitivität und Stabilität der Vitamere und der Einfachheit der Messmethode. Die Methode war praktisch in der Anwendung und kann anderen Labors empfohlen werden.

## 4.2 Vitamin-B6-Belastung von Nierensteinpatienten und gesunden Freiwilligen

### 1 ZUSAMMENFASSUNG

Der grösste Teil der Oxalatausscheidung im Urin hat einen metabolischen Ursprung. Um eine exzessive Oxalatproduktion aus Glyoxylat zu verhindern, wird das Glyoxylat in Glycin transaminiert. Dazu benötigt das Apoenzym jedoch Vitamin B6, welches als Kofaktor im Alanin-Glyoxylat-Transaminase-Weg dient. Bedingt durch die Rolle, die Vitamin B6 im Oxalatmetabolismus spielt und dem nachgewiesenen Erfolg bei der Behandlung von Patienten mit primärer Hyperoxalurie, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die sogenannte idiopathische Hyperoxalurie mit oder ohne Hyperglykolyturie durch Vitamin-B6-Mangel verursacht ist entweder infolge einer ungenügenden Zufuhr, einer ungenügenden Absorption im Darm oder einer gestörten Aktivierung von Vitamin B6.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden 24h-Urine und Nüchternblutproben von 157 gesunden Probanden, 78 idiopathischen Kalziumsteinpatienten ohne Hyperoxalurie und 79 idiopathischen Kalziumsteinpatienten mit Hyperoxalurie, welche unter ihrer freien Diät standen, untersucht. Aus dieser Gesamtpopulation nahmen 50 gesunde Probanden, 15 Patienten ohne Hyperoxalurie und 40 Patienten mit Hyperoxalurie freiwillig an einem 7-tägigen Vitamin-B6-Belastungstest teil.

Vor der Vitamin-B6-Belastung wurde für die Urinausscheidung an 4-Pyridoxinsäure zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden. 8 Patienten, 4 Patienten mit und 4 Patienten ohne Hyperoxalurie, hatten eine Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure, die tiefer war als der 5-95%-Referenzbereich von gesunden Männern ( $N=157$ ;  $3.9-14.4\mu\text{mol}/24\text{h}$ ). Bei den Patienten ohne Hyperoxalurie war die Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat niedriger als bei den gesunden Probanden, aber höher als bei den Patienten mit Hyperoxalurie. Die Unterschiede für das Pyridoxal 5'-Phosphat zwischen den Patienten und den Probanden waren signifikant. Bei 23 Patienten mit und bei 15 Patienten ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden ( $N=105$ ;  $50.8-152.6\text{nmol/l}$ ).

Auch nach der Vitamin-B6-Belastung wurden zwischen den drei Gruppen für die Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Zwar stieg die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat bei allen Teilnehmern an, blieb jedoch bei 2 Patienten ohne Hyperoxalurie und 13 Patienten mit Hyperoxalurie, tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der Probanden ( $N=50$ ;  $312-834\text{nmol/l}$ ). Die Unterschiede für das Pyridoxal 5'-Phosphat zwischen den Kalziumsteinpatienten und den Probanden waren signifikant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass idiopathische Kalziumsteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie eine mit gesunden Probanden vergleichbare Zufuhr und Absorption an Vitamin B6 haben. Allerdings scheinen mehr als ein Drittel der Patienten mit Hyperoxalurie bzw. ein Viertel der Patienten ohne Hyperoxalurie eine gestörte Aktivierung von Vitamin B6 aufzuweisen, die massgeblich an der Ausbildung dieses Krankheitsbildes beteiligt sein könnte.

## 2 EINLEITUNG

---

Pyridoxin ist ein Koenzym in der Umwandlung von Glyoxylat in Glycin [Sidhu 1986]. Bei ernährungsbedingtem Mangel an Thiamin und Pyridoxin konnte gezeigt werden, dass es zu Hyperoxalurie und Nierensteinbildung beim Menschen und im Tierexperiment kommt [Sidhu 1986, Krídl 1984].

Andererseits ist seit vielen Jahren bekannt, dass Pyridoxin die Oxalatausscheidung bei 25-30% der Patienten mit primärer Hyperoxalurie vom Typ I reduzieren oder gar normalisieren kann [Latta 1999]. Vereinzelt Fallberichten zufolge konnte auch bei Kindern mit primärer Hyperoxalurie durch eine hochdosierte Vitamin-B6-Therapie eine deutliche Reduktion der Oxalatausscheidung erzielt werden [Hautmann 1992]. Bei einigen Patienten mit primärer Hyperoxalurie reichte sogar schon die Einnahme von kleinen Dosen, während es bei anderen Patienten nicht zu einer messbaren Reduktion der Hyperoxalurie kam [Latta 1999]. Auch die Langzeiteffekte einer Behandlung mit Pyridoxin und Orthophosphat bei 25 Patienten mit primärer Hyperoxalurie vom Typ I und II wurden untersucht [Milliner 1994]. Es zeigte sich, dass die Ausscheidung an Oxalat in ein paar homozygoten Patienten abnahm. Allerdings schien Pyridoxin in symptomatischen Heterozygoten effektiver, da sich dort die Oxalatausscheidung um bis zu 10% reduzierte.

Nicht nur bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie sondern auch bei Patienten mit idiopathischer Hyperoxalurie und der Bildung von Kalziumoxalatnierensteinen wurde Pyridoxin mit Erfolg verabreicht [Mitwalli 1988]. Tägliche, orale Dosen von 250-500mg Pyridoxin verringerten die Urinoxalatausscheidung signifikant. In dieser Zeit zeigten acht von zwölf Patienten kein Anzeichen einer aktiven Steinerkrankung, und keiner dieser Patienten entwickelte irgendwelche signifikanten Komplikationen.

Mit dieser Studie sollte an Nierensteinpatienten mit idiopathischer Hyperoxalurie der Einfluss von Vitamin B6 auf die Oxalatausscheidung im 24-Stunden-Urin in Abhängigkeit von Pyridoxal 5'-Phosphat im Serum und von 4-Pyridoxinsäure im Urin untersucht werden. Wir wollten beobachten, ob gewisse Nierensteinpatienten eine Hyperoxalurie als Konsequenz eines Mangels an Vitamin B6 entwickeln, verursacht durch eine ungenügende Zufuhr, eine ungenügende Absorption im Darm und/oder einer gestörten Aktivierung von Vitamin B6.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

#### 3.1 PRÜFUNGSANLAGE

##### 3.1.1 Prüfungsdesign

Es handelte sich um eine offene, nicht randomisierte, stratifizierte Studie mit Wash-out-Phase und Gruppenvergleich. Die Studie wurde monozentrisch am Ambulatorium der Medizinischen Universitätspoliklinik, Inselspital, Bern, durchgeführt.

##### 3.1.2 Prüfmateriale

Als Verum dienten Benadon® Tabletten mit Bruchrille, enthaltend 300mg reines, synthetisch gewonnenes Pyridoxin in Form des Hydrochlorids [Morant 1994a]. Es entspricht in seiner biologischen Wirksamkeit dem natürlichen Vitamin B6. Die Studie wurde ohne Placebo durchgeführt.

##### 3.1.3 Dosierung

Jeden Morgen nahm der Patient/Proband unmittelbar vor dem Frühstück eine Tablette unzerkaut mit einem halben Glas Flüssigkeit ein.

##### 3.1.4 Behandlungsdauer

Die Behandlung erstreckte sich über sieben Tage.

#### 3.2 WIRKSTOFF-CHARAKTERISIERUNG

Siehe Kapitel '3 Vitamin B6 - Pyridoxin'

#### 3.3 AUSWAHL DER PATIENTEN

##### 3.3.1 Rekrutierung

Die Patienten wurden aus Nierensteinpatienten selektioniert, die zwischen Januar 1993 und März 1999 wegen ihres Steinleidens im Ambulatorium der Medizinischen Universitätspoliklinik zu einer Abklärung erschienen und an der interdisziplinären Fallbesprechung (Nierenstein-Sprechstunde) vorgestellt worden waren. Danach wurden sie durch den betreuenden Arzt anlässlich der Schlussbesprechung informiert und auf die Studie aufmerksam gemacht. Oft wurden interessierte Patienten vom Arzt oder von der Ernährungsberaterin auch direkt zur Studienleiterin geschickt. Patienten, die die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, aber nicht mehr in ambulanter Behandlung standen, erhielten von der Studienleiterin per Post einen unverbindlichen, informativen Brief über die Studie zugeschiedt. Bei Interesse und/oder Fragen konnten sich die Patienten dann direkt mit der Studienleiterin in Verbindung setzen.

##### 3.3.2 Einschlusskriterien

- Absolvierte Routine-Abklärung im Ambulatorium, i.R. bestehend aus: Allgemeine Anamnese, klinische Status, Blut- und Urinuntersuchungen, Steinanalyse, radiologischen Untersuchungen, Diät-Anamnese, interdisziplinäre

Fallbesprechung, Besprechung des Therapieplans mit dem Patienten, Ernährungsberatung, Bericht an den zuweisenden Arzt/Hausarzt, ambulanten Nachkontrollen nach 3, 6 und 12 Monaten

- Idiopathisches Kalziumsteinleiden, rezidivierend, mit mindestens zwei Steinabgängen
- Männer im Alter von 20-90 Jahren
- Mit Hyperoxalurie (HO; definiert als Oxalurie  $> 450\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) in mindestens zwei von drei 24h-Urinsammlungen (withHO) oder
- Ohne Hyperoxalurie in drei von drei 24h-Urinsammlungen (noHO)

### **3.3.3 Ausschlusskriterien**

- Primärer Hyperparathyreoidismus [Balcke 1983, Hess 1995a]
- Renal tubuläre Acidose [Balcke 1983, Hess 1995a]
- Sarkoidose [Hess 1995a]
- Primäre Hyperoxalurie [Balcke 1983]
- Harnwegsinfektionen [Prien 1974, Rattan 1994]
- Krankheiten, die die Absorption, den Metabolismus oder die Exkretion von Vitamin B6 beeinflussen [Hansen 1997]
- Bekannte Überempfindlichkeit gegen Vitamin B6 [Morant 1994a]
- Einnahme von Levodopa [Morant 1994a]
- Einnahme von Vitamin-B6-Antagonisten (Isoniazid, Penicillamin, D-Cycloserin, Hydralazin, 4-Desoxypyridoxin, Thiosemicarbazon) [Morant 1994a]
- Einnahme von Eisenpräparaten [Hartke 1986c]
- Akne vulgaris [Morant 1994b]
- Plasmakreatinin  $>130\mu\text{mol/l}$
- Andere Nierenerkrankungen
- Vitaminsupplementation

### **3.3.4 Begleitmedikation**

Es wurden nur diejenigen Medikamente toleriert, die für den Patienten notwendig waren und die nicht unter 3.3.3 Ausschlusskriterien erwähnt wurden. Eine ev. Begleitmedikation musste durch den Patienten auf dem Fragebogen vermerkt werden.

### **3.3.5 Frühere Medikation**

Eine frühere Einnahme von Vitamin-B6-Antagonisten und/oder Levodopa wurde nicht toleriert. Bei Einnahme eines Eisenpräparates wurde vor der Teilnahme an der Studie eine einwöchige Wash-out-Phase, bei Vitaminsupplementation eine vierwöchige Wash-out-Phase durchgeführt.

## **3.4 AUSWAHL DER PROBANDEN**

### **3.4.1 Rekrutierung**

Die Probanden wurden durch Anschläge an verschiedenen, gut frequentierten Orten, wie Universitäten, Instituten, Schulen und öffentlichen Gebäuden, in den



Agglomerationen Basel, Bern und Zürich auf die Studie aufmerksam gemacht. Aus den Interessenten, die sich telefonisch, schriftlich oder per e-mail bei der Studienleiterin meldeten, wurden zwischen August 1997 und Juli 1999 die Probanden rekrutiert.

### **3.4.2 Einschlusskriterien**

- Gesunde Männer im Alter von 20-90 Jahren

### **3.4.3 Ausschlusskriterien**

- Positive Familienanamnese für Urolithiasis bzw. Nierenerkrankungen
- Eine vorliegende Erkrankung
- Einnahme von Medikamenten
- Eine Oxalatausscheidung  $>1000\mu\text{mol}/24\text{h}$  mit erhöhtem Glykolat

### **3.4.4 Begleitmedikation**

Es wurde keine Begleitmedikation toleriert.

### **3.4.5 Frühere Medikation**

Eine frühere Einnahme von Vitamin-B6-Antagonisten wurde nicht toleriert. Bei Einnahme eines Eisenpräparates wurde vor der Teilnahme an der Studie eine einwöchige Wash-out-Phase, bei Vitaminsupplementation eine vierwöchige Wash-out-Phase durchgeführt.

## **3.5 DURCHFÜHRUNG DER VITAMIN-B6-BELASTUNG**

### **3.5.1 Ausgangswerte**

Als Ausgangswerte dienten bei den Patienten die im Rahmen der Routine-Abklärung am Untersuchungstag A1 entnommenen Nüchternblutentnahmen sowie die am Vortag gesammelten 24h-Urine A1.

Als Ausgangs- und gleichzeitig auch Normwerte dienten die von den Probanden gesammelten 24h-Urine und die am Tag darauf erfolgten Nüchternblutentnahmen.

### **3.5.2 Vitamin-B6-Belastung**

Während der ganzen Studie lebten die Teilnehmer in ihrem häuslichen Umfeld, assen ihre gewohnte, uneingeschränkte Diät und behielten ihre gewohnte, körperliche Aktivität bei. Vier Wochen vor der Einnahme der ersten Tablette wurde eine Wash-out-Phase durchgeführt. Ab dieser Phase verzichteten die Versuchspersonen auf die Einnahme von Vitaminsupplementen, Multivitaminpräparaten und mit Vitaminen künstlich angereicherte Nahrungsmittel. Am Tag 0, nach dem Morgenurin, sammelte der Patient/Proband während 24 Stunden den Urin in einer Plastikflasche. In den folgenden sieben Tagen (Tag 1 bis Tag 7) nahm der Patient/Proband jeden Morgen unmittelbar vor dem Frühstück eine Tablette Benadon® unzerkaut mit einem halben Glas Flüssigkeit ein. Am 7. Tag, nach dem Morgenurin, sammelte der Patient/Proband einen zweiten 24h-

Urin. Am 8. und letzten Tag erschien er nüchtern im Ambulatorium der Medizinischen Poliklinik, wo er abgeholt und zum Kalzium-Phosphat-Labor geführt wurde. Dort wurde ihm eine Nüchternblutprobe genommen.

### **3.6 ANZAHL DER PATIENTEN BZW. PROBANDEN**

#### **3.6.1 Basal**

Von den 271 männlichen Nierensteinpatienten, die zwischen Januar 1993 und März 1999 zu einer Abklärung erschienen waren, erfüllten 183 Patienten (67.5%) die Einschlusskriterien. Von 12 Patienten fehlten in der Krankengeschichte das Körpergewicht und/oder die Körpergröße. Von den selektionierten Patienten konnten 157 24h-Urine und 119 Seren analysiert werden.

Aus den gesunden Interessenten wurden zwischen August 1997 und Juli 1999 166 Probanden rekrutiert. 101 gesunde Männer sammelten einen 24h-Urin und kamen am Tag darauf zu einer Nüchternblutentnahme. 59 Probanden sammelten nur einen 24h-Urin und schickten die gefüllte Urinflasche am darauffolgenden Tag direkt ins Labor. 6 Probanden wollten oder konnten keinen Urin sammeln und kamen nur zu einer Nüchternblutentnahme. 3 gesunde Freiwillige wollten keine Angaben zu Gewicht und/oder Körpergröße machen. Als Ausgangswerte und zur Berechnung des Referenzbereichs dienten somit 157 24h-Urine und 105 Nüchternblutproben.

#### **3.6.2 Vitamin-B6-Belastung**

Von den selektionierten Patienten und gesunden Probanden machten 47 Patienten mit Hyperoxalurie, 15 Patienten ohne Hyperoxalurie und 51 gesunde Freiwillige an der Vitamin-B6-Belastung mit.

### **3.7 MATCHING**

Es wurde nicht versucht, die Patienten mit den gesunden Probanden bezüglich Alter, Körpergewicht, Körpergröße oder BMI zu matchen. Statistische Berechnungen innerhalb der drei Gruppen (withHO, noHO, gesunde Probanden) ergaben keine Hinweise auf Korrelationen zwischen den Vitamin-B6-Metaboliten Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure betreffend Alter, Körpergewicht, Körpergröße oder BMI.

### **3.8 BEURTEILUNGSPARAMETER**

#### **3.8.1 Probensammlung und -aufbereitung**

Sowohl basal als auch unter Vitamin-B6-Belastung wurden 24h-Urine gesammelt und Nüchternblutproben genommen.

Die Urinsammlung begann mit dem 2. Morgenurin, dauerte 24 Stunden und beinhaltete den 1. Morgenurin des folgenden Tages [Pannemans 1994]. Der Urin wurde in einer 3.3 Liter fassenden Plastikflasche gesammelt, die 10g Borsäure (Nr. 1.00165.1000; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Konservierungsstoff enthielt [Hess 1995a]. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Vitamin-B6-Derivate [EDI 1995, Hartke 1986c] wurden die Versuchspersonen an-

gehalten, die Urinflasche während der Sammlung an einem dunklen, kühlen Ort aufzubewahren. Die gefüllte Urinflasche wurde am folgenden Tag von der Versuchsperson persönlich im Kalzium-Phosphat-Labor abgegeben, zur Blutentnahme mitgebracht oder pauschalfrankiert per A-Post direkt ans Labor geschickt. Von jedem 24h-Urin wurden 3 Röhrchen zu je 10ml abgefüllt. 3 weitere Röhrchen zu je 10ml Urin wurden mit je 4 Tropfen konzentrierter Salzsäure (Nr. 317.1000; E. Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt, um einerseits eine Oxalatkristallisation und andererseits eine Umwandlung von Ascorbat in Oxalat zu verhindern [Milliner 1994]. Sämtliche 6 Röhrchen wurden danach bis zur Analyse bei -25°C eingefroren.

Die Nüchternblutproben wurden jeweils am Morgen nach der 24h-Urinsammlung entnommen und bestanden aus ca. 50ml venösem Blut. Serum wurde nach einer 10minütigen Zentrifugation (Modell Megafuge 3.0R; Heraeus Sepatech GmbH, Zürich, Schweiz) mit 3000rpm aus Nativblut, Plasma nach Zentrifugation aus heparinisiertem Blut gewonnen. Serum und Plasma wurden sofort eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.8.2 Analysenmethoden**

Vom 24h-Urin wurden zuerst das Volumen und dann mittels pH Meter (Modell 940 Expandable Ionanalyzer; Orion Research AG, Küsnach, Schweiz) der pH bestimmt. Die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphat, Harnstoff, Kreatinin, Magnesium und Harnsäure wurden durch Autoanalyzer-Technik im Chemischen Zentrallabor gemessen. Oxalat, Glykolat, Sulfat, Zitrat und 4-Pyridoxinsäure wurden im Kalzium-Phosphat-Labor gemessen. Dabei wurde Oxalat mittels Oxalat-Oxidase und HPLC [Buttery 1983], Glykolat mittels Glykolsäure-Oxidase, Zitrat mittels Zitrat-Lyase [Welshman 1973] und Sulfat mittels HPLC [Buchholz 1982] bestimmt. 4-Pyridoxinsäure wurde mittels HPLC bestimmt. Die Proteinzufuhr in der Diät in g/24h wurde folgendermassen berechnet:  $0.175 \times \text{Harnstoff-Ausscheidung in mmol/24h} + 0.2 \times \text{kg Körpergewicht}$  [Maroni 1985]. Die Kreatinin-Clearance wurde berechnet aus der Kreatininausscheidung im Urin pro 24h dividiert durch 1440 Minuten und durch die Plasmakreatininkonzentration [Colombo 1994].

Die Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid, totales Kalzium, Phosphat, Magnesium, Harnsäure, Protein, Albumin, Harnstoff und Kreatinin wurden durch Autoanalyzer-Technik im Chemischen Zentrallabor gemessen. Im Serum wurde das ionisierte Kalzium mittels einer ionenselektiven Elektrode (Modell 634  $\text{Ca}^{++}/\text{pH}$  Analyzer; Ciba-Corning, Chiron Diagnostics AG, Dietlikon, Schweiz), das Intakt-Parathormon durch eine radioimmunometrische Methode (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA) und die Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat mittels HPLC bestimmt (s. Kapitel "Entwicklung einer Messmethode für Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure"). Alkalische Phosphatase, Bicarbonat und Glucose wurden durch das Chemische Zentrallabor mit unterschiedlichen Methoden gemessen.

### **3.8.3 Unerwünschte Wirkungen**

Die unerwünschten Wirkungen wurden anhand eines Fragebogens erfasst und laufend auf ihre Relevanz geprüft.

### **3.8.4 Compliance**

Der Patient/Proband bestätigte täglich die korrekte Einnahme der Tabletten auf dem Fragebogen. Zusätzlich wurde die Compliance durch Messung der 4-Pyridoxinsäure überprüft.

## **3.9 ABBRUCH UND ABSCHLUSS DER KLINISCHEN STUDIE**

Die klinische Studie wäre unverzüglich abgebrochen worden beim Auftreten von starken, unerwünschten Wirkungen. Nach Erreichen der erforderlichen Anzahl Versuchspersonen wurde sie offiziell beendet.

### **3.10 DROP-OUT'S**

Als Drop-Out wurde ein Patient/Proband definiert mit mindestens einem der folgenden Ereignisse:

- Das Auftreten starker, unerwünschter Wirkungen
- Eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, die eine Medikation erforderte, die unter den Ausschlusskriterien ausgeschlossen wurde
- Schlechte Compliance, d.h. Vergessen von einer oder gar mehreren Tabletten
- Entscheid vom Patienten/Probanden die Studie abubrechen

Für Drop-out's wurde Ersatz gesucht.

### **3.11 RANDOMISIERUNG UND VERBLINDUNG**

Es wurde keine Randomisierung vorgenommen. Da es sich um eine offene, klinische Studie handelte, waren sowohl die Patienten/Probanden als auch die behandelnden Ärzte über den Inhalt der Tabletten informiert.

### **3.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Die statistische Auswertung wurde durchgeführt mit der Personalcomputer Software StatView<sup>®</sup> for Windows, Version 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC 27513). Bei den im Text, in Tabellen oder Graphiken erwähnten Daten handelt es sich um Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Als Normwerte von gesunden Freiwilligen wurde das 5-95% Quantil des jeweiligen Parameters definiert. Als Mass der Signifikanz diente der p-Wert. Signifikanztests wurden mittels nicht-parametrischer Methoden durchgeführt. Als Mass für einen monotonen Zusammenhang einer Korrelation zwischen zwei Parametern wurde die Spearman'sche Rangkorrelation (engl. Spearman rank correlation) berechnet. Der Vergleich zweier unterschiedlicher Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest (engl. Wilcoxon rank sum test bzw. Mann-Whitney U-Test) durchgeführt, und bei  $\geq 3$  Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet.

Bei gepaarten Daten innerhalb einer Gruppe wurde die Signifikanz mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest (engl. Wilcoxon signed rank test) untersucht.

### 3.13 INFORMATION DES PATIENTEN / PROBANDEN ÜBER DIE PERSÖNLICHEN ERGEBNISSE

Die Patienten und Probanden erhielten nach Abschluss der klinischen Studie eine Kopie der bestimmten, persönlichen Parameter mit Interpretation und Empfehlungen. Zusätzlich wurde bei den Patienten die Teilnahme an der klinischen Studie in deren Krankengeschichte eingetragen.

### 3.14 BEURTEILUNG DES RISIKO / NUTZEN-VERHÄLTNISSES VOR BEGINN DER STUDIE

Trotz langjährigen Erfahrungen mit Benadon® wurde in der Literatur von keinen negativen Vorkommnissen oder relevanten unerwünschten Wirkungen berichtet. Die bis heute bestehenden Therapiemöglichkeiten bei einem Nierensteinleiden befriedigen nicht vollumfänglich; der Nutzen, d.h. die diagnostische und/oder therapeutische Anwendung von Pyridoxin bei idiopathischer Hyperoxalurie und primärer Hyperoxalurie vom Typ I, hingegen war und ist sehr vielversprechend.

### 3.15 ETHISCHE ÜBERLEGUNGEN

Die Studie wurde durchgeführt gemäss:

- Reglement über die Heilmittel im klinischen Versuch. Interkantonale Kontrollstelle für Heilmittel, 18. November 1993
- Gute Praxis des Klinischen Versuchs (GPKV)
- Fakultätsdokument 1088, 2. Mai 1988
- Verordnungen über Forschungsuntersuchungen am Menschen im Kanton Bern. Kantonale Gesundheitsdirektion, August 1989
- Medizinisch-ethische Richtlinien der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, Mai 1984
- Richtlinien für die Organisation und Tätigkeit medizinisch-ethischer Kommissionen zur Beurteilung von Forschungsuntersuchungen am Menschen. Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, 11. Mai 1989
- Deklaration von Helsinki, Juni 1964, revidiert in Tokio, Oktober 1975, Venedig, Oktober 1983, und Hong Kong, September 1989
- Proposed International Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. CIOMS, Geneva, 1982
- Good Clinical Practice for Trial on Medicinal Products in the European Community. CPMP Working Party on Efficacy of Medicinal Products, 1990

### 3.16 WRITTEN INFORMED CONSENT

Die für den Patienten/Probanden nötigen Informationen wurden sowohl mündlich, durch den behandelnden Arzt und/oder die Studienleiterin, als auch schriftlich abgegeben. Dabei wurde der Patient/Proband über die nachfolgenden Punkte informiert:

- Ziel des klinischen Versuchs
- Auswahl der Patienten/Probanden
- Alle Untersuchungen, welche der Patient/Proband im Rahmen des klinischen Versuchs hinzunehmen hat
- Umschreibung alternativer Behandlungen
- Risiken und Unannehmlichkeiten
- Zu erwartender Nutzen
- Ergebnisse, die die Sicherheit des Patienten/Probanden beeinflussen könnten
- Schutz der persönlichen Daten
- Finanzielle Regelung
- Abbruch des klinischen Versuchs
- Das Entschädigungsverfahren sowie die vorgesehene Behandlung im Falle von Schädigung oder Invalidität
- Name, Adresse und Telefonnummer der Person, welche zur Beantwortung aller den klinischen Versuch betreffenden Fragen sowie beim Auftreten von Problemen zur Verfügung steht
- Sämtliche Rechte der Versuchsperson

Zudem wurde die frei, ausdrücklich und nach Aufklärung erteilte Einwilligung des Patienten/Probanden schriftlich eingeholt.

### 3.17 FINANZIELLE REGELUNG

Die materiellen und personellen Kosten, die im Zusammenhang mit dieser Studie entstanden, gingen zu Lasten des zur Verfügung stehenden Kredites des wissenschaftlichen Fonds des Phospho-Calciq. Zur Abgeltung allfälliger Kosten wurden die Patienten mit SFr. 100 entschädigt. Die Probanden erhielten als Entgelt pro 24h-Urin SFr. 20, pro Blutentnahme SFr. 30 und bei Teilnahme an der Vitamin-B6-Belastung zusätzlich SFr. 30.

### 3.18 VERSICHERUNGEN / HAFTUNG

Das Inselspital verfügte über eine Betriebshaftpflichtversicherung und arbeitete mit den folgenden Versicherungsgesellschaften zusammen:

- Berner Versicherungen, Sulgeneckstrasse 19, Postfach, CH-3001 Bern
- Winterthur-Versicherungen, Laupenstrasse 19, Postfach, CH-3001 Bern

Für alle das Medikament betreffende Belange haftete die Firma:

- Roche Pharma (Schweiz) AG, Schöneggstrasse 2, CH-4153 Reinach

### 3.19 DATENSCHUTZ

Der Schutz der persönlichen Daten der Patienten/Probanden wurde gewährleistet. Die gesetzlichen Regelungen über den Datenschutz bleiben vorbehalten.

### 3.20 VERANTWORTUNGSBEREICHE

Die Studie wurde unter der Leitung von Frau A. Kälin, Apothekerin, Medizinischen Universitätspoliklinik, Inselspital, 3010 Bern, im Rahmen der Forschungstätigkeit des Kalzium-Phosphat-Labors durchgeführt und stand unter der Supervision von Herrn Prof. Dr. med. Ph. Jaeger, Direktor und Chefarzt der Medizinischen Universitätspoliklinik, Inselspital, 3010 Bern.

### 3.21 MEDIZINISCH-ETHISCHER KONSENS

Die vorliegende klinische Studie wurde unter dem Titel "Die Rolle einer Therapie mit Pyridoxin auf die Oxalurie von Patienten mit Nierensteinleiden", am 12. November 1996, ordnungsgemäss der Kommission für medizinisch-ethische Fragen der Fakultät Bern vorgelegt und von ihr am 26. November 1996 in medizinisch-ethischer Hinsicht gebilligt. Aus diesem Grund erteilte die Kommission der Hauptgesuchstellerin, Frau A. Kälin, offiziell die medizinisch-ethische Genehmigung zur praktischen Ausführung des eingereichten Projektes (Interne Gesuchsnummer 193/96). Zwei nachfolgende Erweiterungen des ursprünglichen Versuchsplans wurden am 12. Mai 1997 und am 16. Februar 1999 von der gleichen Kommission billigend zur Kenntnis genommen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 URINPARAMETER VON PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN VOR DER VITAMIN-B6-BELASTUNG

#### 4.1.1 Vergleich der drei Gruppen

Die Urinparameter sowie die Charakteristik der Probanden und der Nierensteinpatienten sind in der Tabelle 11 dargestellt.

Die gesunden Probanden waren jünger, grösser, weniger schwer und hatten auch einen kleineren BMI als die Patienten, während die beiden Patienten-Gruppen in dieser Hinsicht keine sicheren Unterschiede aufwiesen.

Die Patienten mit Hyperoxalurie hatten eine grössere Ausscheidung an U-Kreatinin, U-Oxalat, U-Chlorid, U-Harnsäure, U-Harnstoff, U-Kalium, U-Kalzium, U-Magnesium, U-Natrium und U-Phosphat als die Patienten ohne Hyperoxalurie. Ebenfalls grösser waren die Proteinzufuhr, der U-pH und das U-Volumen.

Tabelle 11: Charakteristik und Urinparameter von gesunden Probanden und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

Parameter	Gruppe			p <sup>†</sup>		
	Probanden (N=157)	noHO (N=78)	withHO (N=79)	noHO vs. withHO	noHO vs. Probanden	withHO vs. Probanden
Alter (J)	39.1 ± 10.5	45.1 ± 11.6	45.4 ± 12.6	ns	<0.001	<0.001
Körpergewicht (kg)	75.2 ± 10.4	79.3 ± 13.1	81.8 ± 11.6	0.048	0.019	<0.001
Körpergrösse (m)	1.78 ± 0.07	1.75 ± 0.07	1.75 ± 0.07	ns	0.017	0.004
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 3.2	25.8 ± 3.5	26.9 ± 3.7	ns	<0.001	<0.001
U-4PA (μmol/24h)	8.29 ± 6.62	7.54 ± 4.33	8.15 ± 4.79	ns	ns	ns
U-Glycolat (μmol/24h)	373 ± 175	473 ± 204	558 ± 276	ns	<0.001	<0.001
U-Kreatinin (μmol/24h)	14123 ± 2817	15344 ± 3215	17010 ± 3901	0.023	<0.001	<0.001
U-Oxalat (μmol/24h)	412 ± 143	301 ± 88	550 ± 171	<0.001	<0.001	<0.001
U-pH	6.16 ± 0.46	5.85 ± 0.46	6.04 ± 0.47	0.012	<0.001	ns
U-Sulfat (mmol/24h)	23.6 ± 8.6 <sup>§</sup>	23.5 ± 10.5	24.9 ± 9.2	ns	ns	ns
U-Volumen (ml)	1834 ± 723	1749 ± 717	2316 ± 795	<0.001	ns	<0.001
U-Zitrat (mmol/24h)	4025 ± 1533 <sup>§</sup>	2825 ± 1139	3286 ± 1524	ns	<0.001	0.034
U-Chlorid (mmol/24h)		185 ± 64	241 ± 94	<0.001		
U-Harnsäure (μmol/24h)		3574 ± 973 <sup>‡</sup>	4141 ± 1272	0.008		
U-Harnstoff (mmol/24h)		413 ± 98	484 ± 149	0.003		
U-Kalium (mmol/24h)		67.6 ± 20.5	81.0 ± 33.4	0.002		
U-Kalzium (mmol/24h)		6.52 ± 2.70	8.64 ± 3.81	<0.001		
U-Magnesium (mmol/24h)		4.57 ± 1.41 <sup>‡</sup>	5.76 ± 2.78	0.001		
U-Natrium (mmol/24h)		180 ± 61	240 ± 96	<0.001		
U-Phosphat (mmol/24h)		32.5 ± 8.8	41.6 ± 20.2	0.002		
Proteinzufuhr (g/24h)		88.2 ± 17.3	101.0 ± 26.8	<0.001		

\*Mittelwert ± Standardabweichung. †Mann-Whitney U Test. ‡N=77. §N=21.



In Abbildung 10 sind die Ausscheidungen von U-Oxalat, U-Glykolat und U-Kreatinin abgebildet.

Erwartungsgemäss war das U-Oxalat bei den Patienten ohne Hyperoxalurie niedriger und bei den Patienten mit Hyperoxalurie höher als bei den gesunden Probanden. Auffallend war auch, dass nicht alle Patienten mit Hyperoxalurie in dieser 24h-Urinsammlung auch eine erhöhte Oxalurie aufwiesen.

Das U-Glykolat und das U-Kreatinin waren bei den Steinpapienten höher als bei den gesunden Probanden. Beim U-Glykolat bestand zudem eine beträchtliche Überlappung zwischen den drei Gruppen.

In Abbildung 11 sind die Ausscheidung von U-Zitrat, sowie der pH und das Volumen des 24h-Urins abgebildet.

Verglichen mit den gesunden Probanden hatten beide Patienten-Gruppen ein tieferes U-Zitrat. Zusätzlich unterschieden sich die Patienten ohne Hyperoxalurie durch einen tieferen U-pH und die Patienten mit Hyperoxalurie durch ein grösseres Urinvolumen von den Probanden.

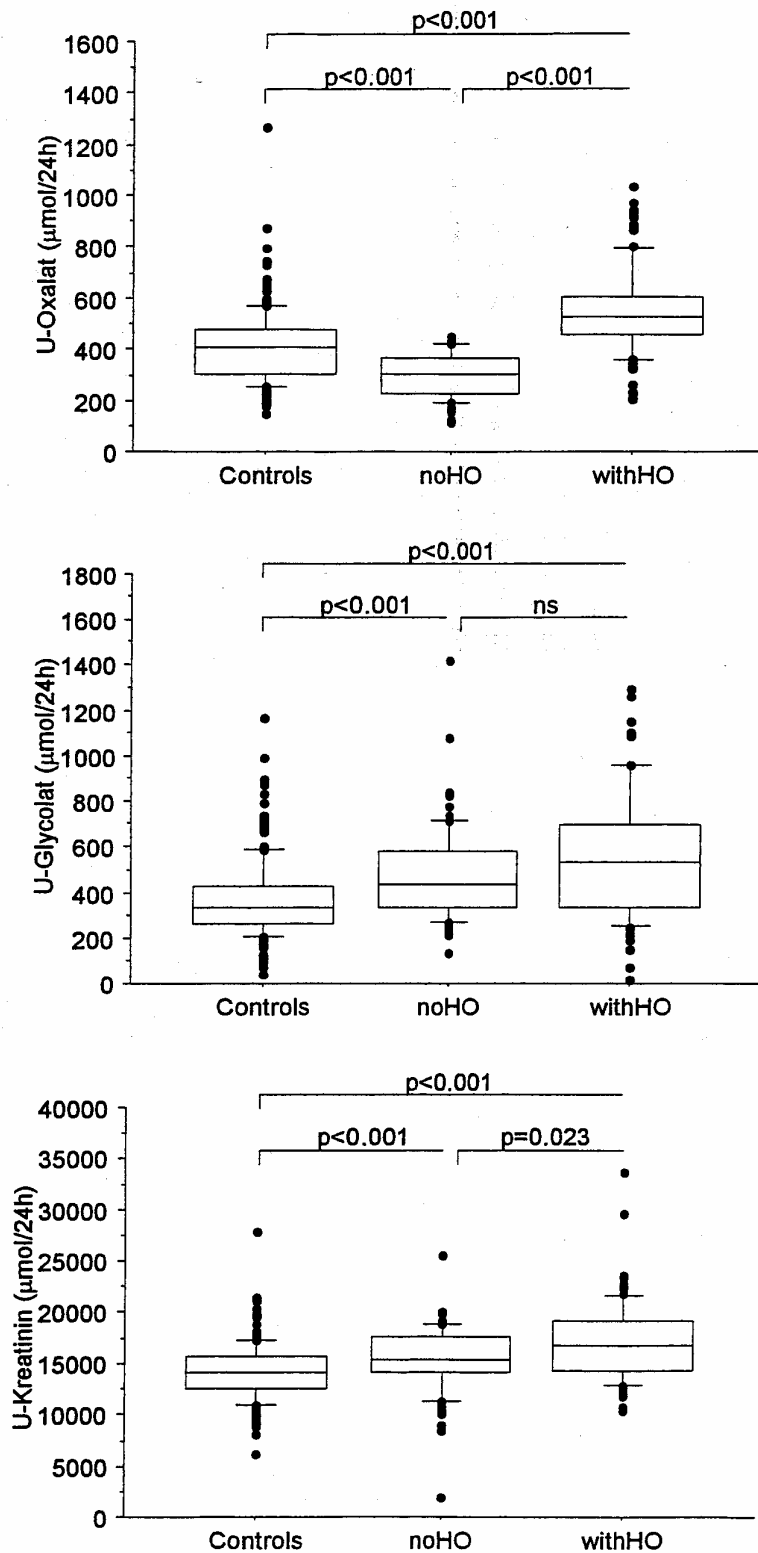


Abbildung 10: Ausscheidung von Oxalat, Glykolat und Kreatinin von gesunden Probanden (Controls) und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

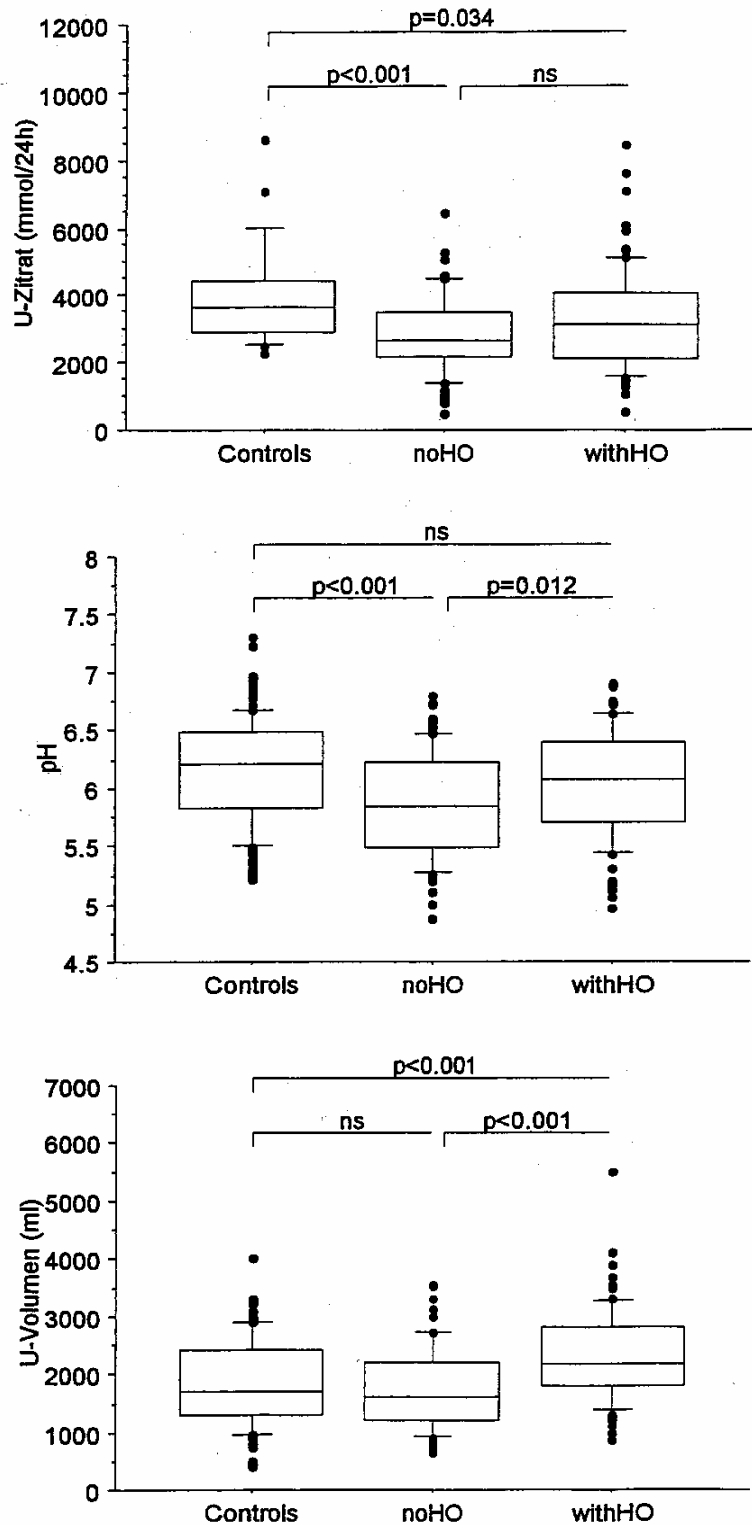


Abbildung 11: Ausscheidung von Zitrat, sowie pH und Volumen des 24h-Urins von gesunden Probanden (Controls) und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

Für die Ausscheidungen an 4-Pyridoxinsäure und U-Sulfat wurden zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede gefunden.

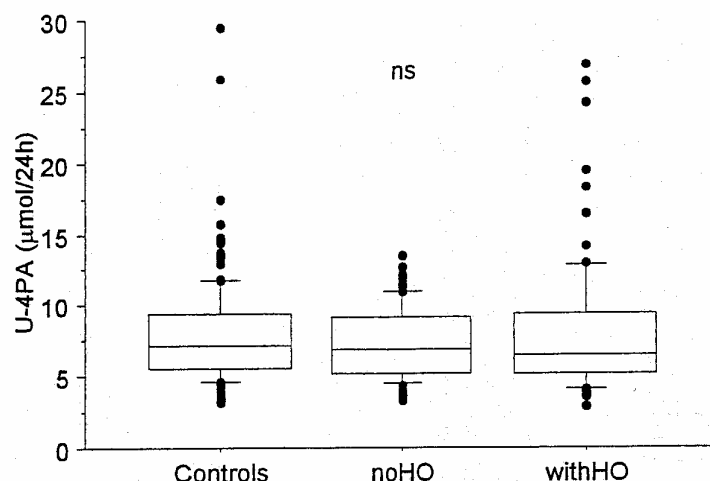


Abbildung 12: Ausscheidung der 4-Pyridoxinsäure von gesunden Probanden (Controls) und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

#### **4.1.2 Lineare Beziehungen der 4-Pyridoxinsäure**

In der Tabelle 12 sind die Korrelationskoeffizienten  $r$  und die Signifikanz  $p$  der 4-Pyridoxinsäure dargestellt.

Bei allen drei Gruppen wurden zwischen der 4-Pyridoxinsäure und der Körpergröße bzw. dem BMI keine Korrelationen gefunden. Im Gegensatz zu den Steinpatienten war bei den gesunden Probanden die 4-Pyridoxinsäure mit dem Alter, Körpergewicht, U-Glykolat, U-Oxalat, U-pH und dem U-Volumen korreliert.

Nur bei den gesunden Probanden und bei den Patienten ohne Hyperoxalurie wurde eine lineare Beziehung zwischen der 4-Pyridoxinsäure und der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat gefunden (s. Abbildung 13).

In Abbildung 14 ist die Korrelation zwischen der 4-Pyridoxinsäure und dem U-Kreatinin dargestellt, welche jedoch nur bei den gesunden Probanden und den Patienten mit Hyperoxalurie vorhanden war.

Zusätzlich wurden bei den Nierensteinpatienten positive Korrelationen zwischen der 4-Pyridoxinsäure und dem U-Phosphat, U-Kalium und dem U-Harnstoff festgestellt (s. Abbildung 15).

Tabelle 12: Korrelationen der 4-Pyridoxinsäure mit den bestimmten Parametern. Aufgeführt sind die Korrelationskoeffizienten r und die Signifikanz p\*

Parameter	Gruppe					
	Probanden		noHO		withHO	
	r	p	r	p	R	p
Alter	+ 0.18	0.025	+ 0.01	ns	- 0.17	ns
Körpergewicht	+ 0.17	0.033	- 0.01	ns	+ 0.14	ns
Körpergrösse	+ 0.12	ns	+ 0.03	ns	+ 0.21	ns
BMI	+ 0.11	ns	- 0.10	ns	+ 0.01	ns
B-Kreatinin	- 0.09	ns	- 0.24	0.037	- 0.14	ns
Kreatinine-Clearance	+ 0.32	0.003	+ 0.32	0.005	+ 0.48	<0.001
Pyridoxal 5'-Phosphat	+ 0.41	<0.001	+ 0.38	0.005	+ 0.26	ns
U-Glykolat	+ 0.23	0.004	+ 0.03	ns	+ 0.20	ns
U-Kreatinin	+ 0.39	<0.001	+ 0.16	ns	+ 0.44	<0.001
U-Oxalat	+ 0.27	<0.001	+ 0.17	ns	+ 0.19	ns
U-pH	+ 0.16	0.043	+ 0.04	ns	- 0.05	ns
U-Sulfat	+ 0.42	ns	+ 0.22	ns	+ 0.41	<0.001
U-Volumen	+ 0.19	0.018	+ 0.10	ns	+ 0.10	ns
B-Phosphat			+ 0.05	ns	+ 0.24	0.036
U-Kalzium			+ 0.05	ns	+ 0.26	0.022
U-Chlorid			+ 0.13	ns	+ 0.30	0.009
U-Harnsäure			+ 0.16	ns	+ 0.38	<0.001
U-Harnstoff			+ 0.24	0.034	+ 0.47	<0.001
U-Kalium			+ 0.36	0.002	+ 0.34	0.003
U-Magnesium			+ 0.19	ns	+ 0.42	<0.001
U-Natrium			+ 0.16	ns	+ 0.27	0.018
U-Phosphat			+ 0.38	<0.001	+ 0.38	<0.001
Proteinzufuhr			+ 0.02	ns	+ 0.36	<0.001

\*Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman.

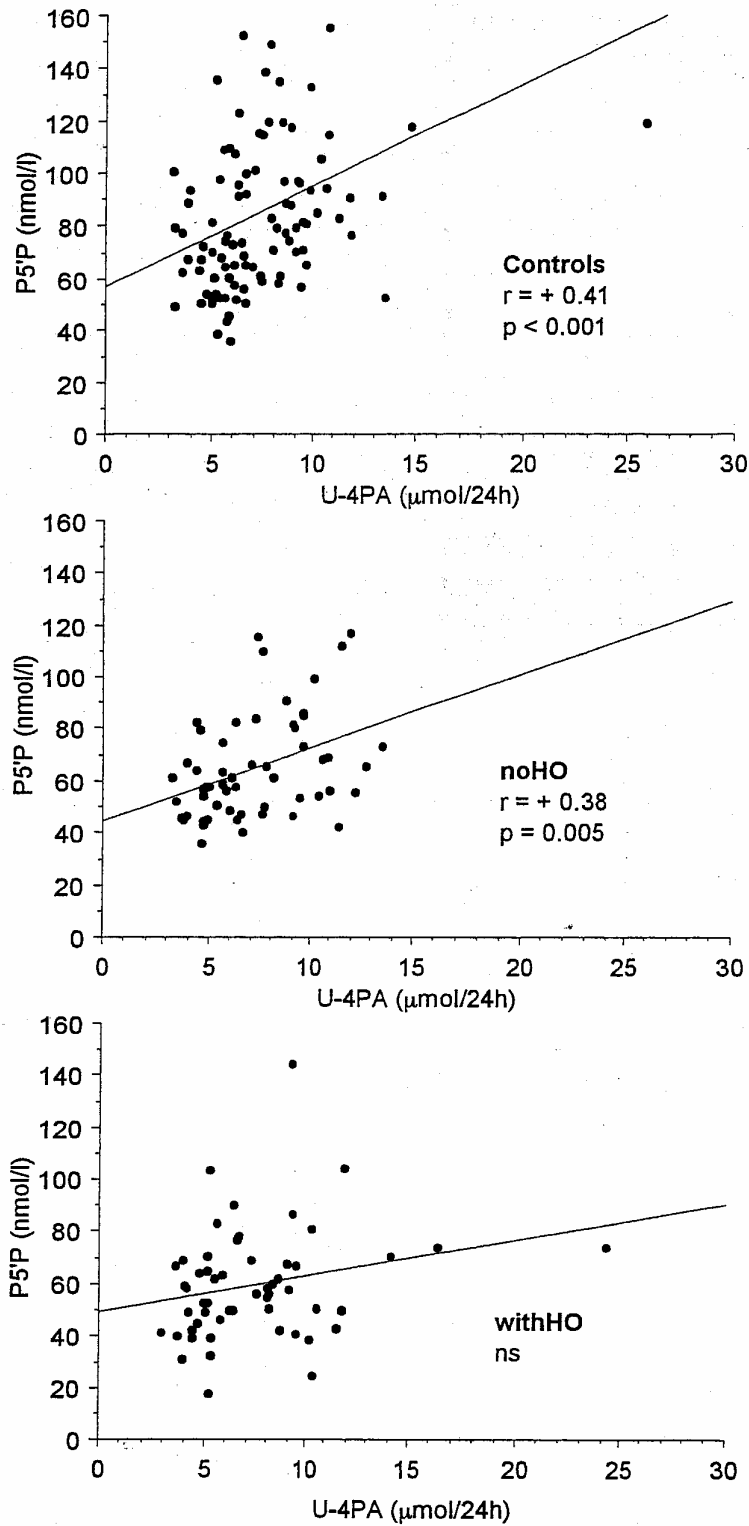


Abbildung 13: Korrelation zwischen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat und der Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure bei den gesunden Probanden (Controls) und bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

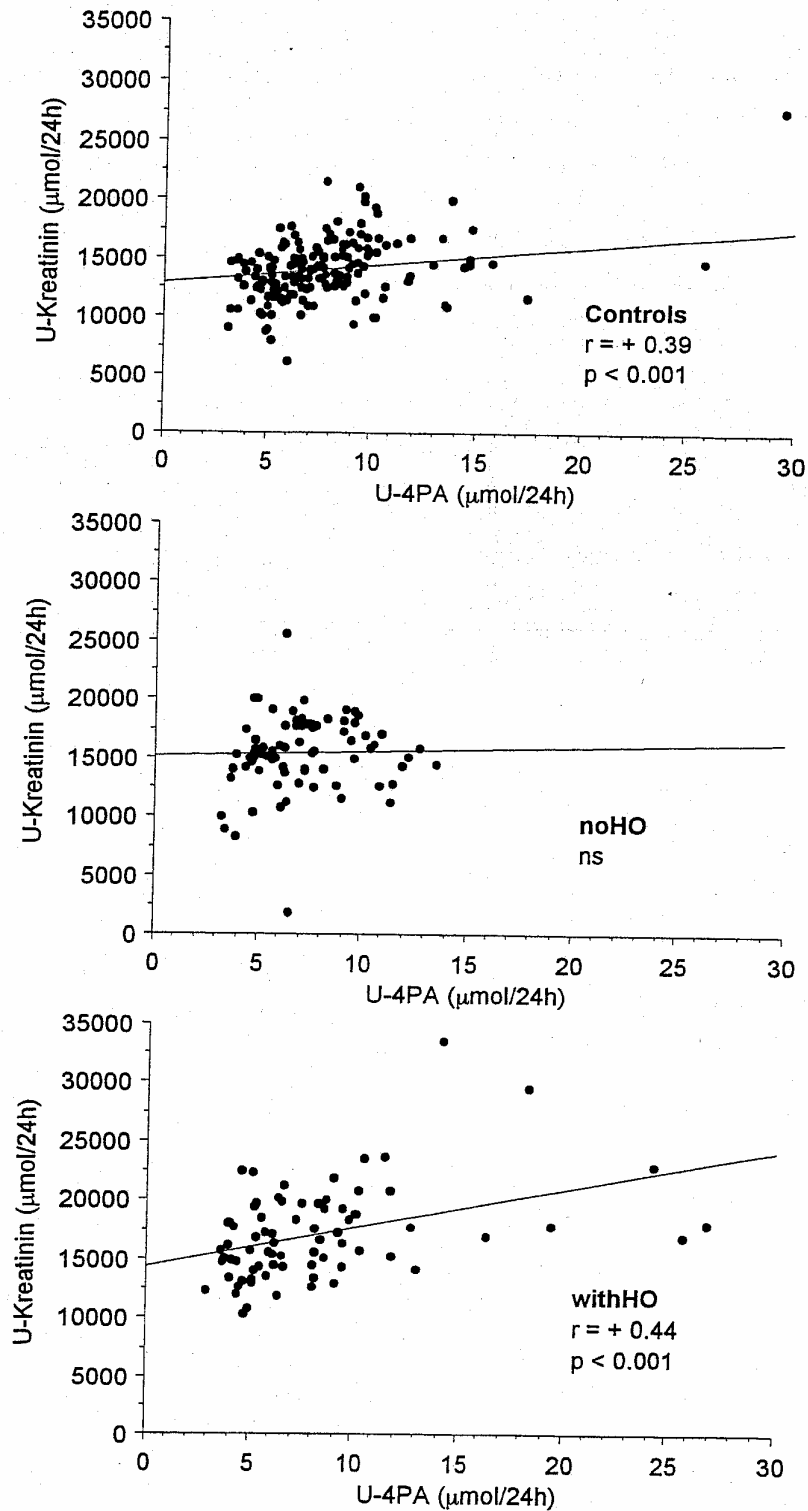


Abbildung 14: Korrelation zwischen der Ausscheidung an Kreatinin und der 4-Pyridoxinsäure bei den gesunden Probanden (Controls) und bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

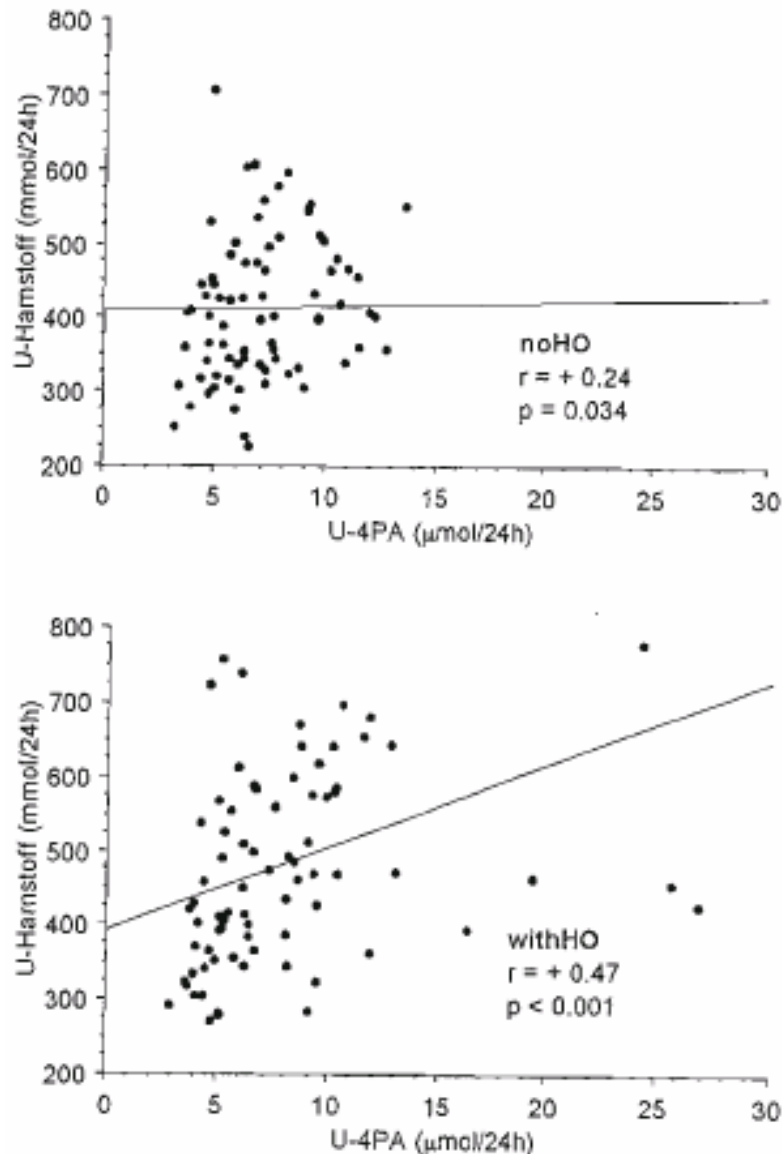


Abbildung 15: Korrelation zwischen der Ausscheidung an Harnstoff und der 4-Pyridoxinsäure bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

## 4.2 BLUTPARAMETER VON PROBANDEN UND NIERENSTEINPATIENTEN VOR DER VITAMIN-B6-BELASTUNG

### 4.2.1 Vergleich der drei Gruppen

Die Blutparameter sowie die Charakteristik der Probanden und der Nierensteinpatienten sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Die gesunden Probanden waren jünger, grösser, weniger schwer und hatten einen kleineren BMI als die Steinpatienten. Zusätzlich war bei den Probanden das ionisierte B-Kalzium höher und das B-Kreatinin kleiner. Zwischen den beiden Patienten-Gruppen hingegen wurden keine Unterschiede festgestellt.



Tabelle 13: Charakteristik und Blutparameter von gesunden Probanden und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät \*

Parameter	Gruppe			p <sup>†</sup>		
	Probanden (N=105)	noHO (N=59)	withHO (N=60)	noHO vs. withHO	noHO vs. Probanden	withHO vs. Probanden
Alter (J)	37.9 ± 10.1	45.6 ± 11.4	44.0 ± 12.7	ns	<0.001	<0.001
Körpergewicht (kg)	74.5 ± 10.9	79.4 ± 13.6	81.9 ± 12.0	ns	0.014	<0.001
Körpergrösse (m)	1.78 ± 0.07	1.75 ± 0.08	1.75 ± 0.07	ns	0.003	0.007
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 ± 3.4	26.0 ± 3.5	26.7 ± 3.9	ns	<0.001	<0.001
B-Kalzium, ionisiert (mmol/l)	1.25 ± 0.05 <sup>**</sup>	1.23 ± 0.07	1.22 ± 0.07	ns	0.022	0.001
B-Kreatinin (μmol/l)	93.1 ± 10.5 <sup>¶</sup>	97.5 ± 10.7	96.9 ± 9.3 <sup>‡</sup>	ns	0.008	0.013
P5'P (nmol/l)	86.1 ± 30.5	65.1 ± 19.4	60.7 ± 22.7	ns	<0.001	<0.001
B-Albumin (g/l)		41.3 ± 2.9 <sup>  </sup>	40.7 ± 2.8 <sup>‡</sup>	ns		
B-Alkalische Phosphatase (U/l)		74.2 ± 20.0 <sup>§</sup>	72.4 ± 19.8 <sup>‡</sup>	ns		
B-Bicarbonat (mmol/l)		27.9 ± 2.4 <sup>§</sup>	28.1 ± 1.8 <sup>‡</sup>	ns		
B-Chlorid (mmol/l)		105 ± 3	104 ± 2 <sup>‡</sup>	ns		
B-Glucose (mmol/l)		5.41 ± 0.62 <sup>§</sup>	5.78 ± 1.68	ns		
B-Harnsäure (μmol/l)		319 ± 104	331 ± 77	ns		
B-Harnstoff (mmol/l)		5.95 ± 1.31	5.57 ± 1.19 <sup>‡</sup>	ns		
B-Kalium (mmol/l)		4.04 ± 0.31	4.03 ± 0.34	ns		
B-Kalzium (mmol/l)		2.39 ± 0.07	2.39 ± 0.09	ns		
B-Magnesium (mmol/l)		0.84 ± 0.07 <sup>§</sup>	0.83 ± 0.07	ns		
B-Natrium (mmol/l)		142 ± 2	141 ± 2	ns		
B-Phosphat (mmol/l)		0.99 ± 0.16	0.95 ± 0.16 <sup>§</sup>	ns		
B-Proteine (g/l)		77.5 ± 4.0 <sup>§</sup>	77.9 ± 4.4 <sup>‡</sup>	ns		
B-PTH (pg/ml)		35.7 ± 13.5	35.0 ± 11.6	ns		

\*Mittelwert ± Standardabweichung. <sup>†</sup>Mann-Whitney U Test. <sup>‡</sup>N=59. <sup>§</sup>N=58. <sup>||</sup>N=56. <sup>¶</sup>N=93. <sup>\*\*</sup>N=45.

In Abbildung 16 sind die Serumkonzentrationen von Pyridoxal 5'-Phosphat der gesunden Probanden und der Nierensteinpatienten dargestellt.

Die gesunden Probanden hatten eine höhere Konzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat als die beiden Patienten-Gruppen. Bei 5 Patienten mit Hyperoxalurie und bei 1 ohne Hyperoxalurie waren die Konzentrationen von Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der tiefste Wert eines gesunden Probanden (36.2nmol/l). Bei 23 Patienten mit Hyperoxalurie und bei 15 ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden (N=105; 50.8-152.6 nmol/l).

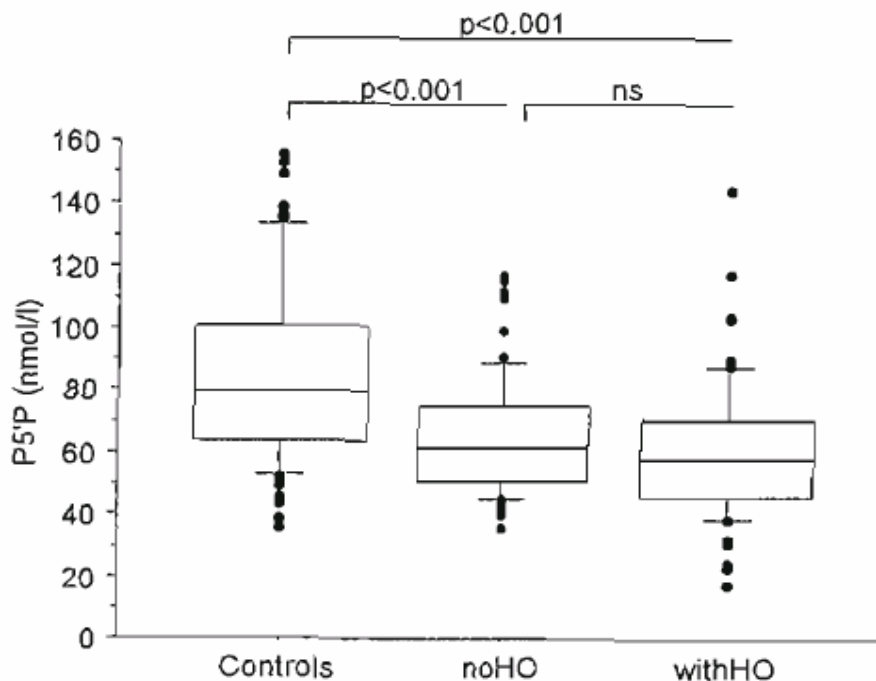


Abbildung 16: Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat von gesunden Probanden (Controls) und von Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

#### **4.2.2 Lineare Beziehungen von Pyridoxal 5'-Phosphat**

In der Tabelle 14 sind die Korrelationskoeffizienten  $r$  und die Signifikanz  $p$  von Pyridoxal 5'-Phosphat dargestellt.

Zwischen Pyridoxal 5'-Phosphat und dem Alter, Körpergewicht, Körpergröße oder BMI wurden keine Korrelationen festgestellt.

Nur bei den Probanden und bei den Patienten ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat mit der 4-Pyridoxinsäure positiv korreliert (s. Abbildung 13).

Bei den Patienten ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat zusätzlich mit dem U-Kalzium und dem U-Magnesium positiv korreliert, während nur bei den Patienten mit Hyperoxalurie das Pyridoxal 5'-Phosphat mit dem U-Zitrat, U-Kreatinin und U-Glykolat positiv korreliert war.

Tabelle 14: Korrelationen von Pyridoxal 5'-Phosphat mit den bestimmten Parametern. Aufgeführt sind die Korrelationskoeffizienten r und die Signifikanz p\*

Parameter	Gruppe					
	Probanden		noHO		withHO	
	r	p	r	p	r	p
Alter	+ 0.08	ns	- 0.24	ns	- 0.18	ns
Körpergewicht	+ 0.04	ns	- 0.09	ns	- 0.01	ns
Körpergrösse	- 0.05	ns	+ 0.22	ns	- 0.04	ns
BMI	+ 0.10	ns	- 0.17	ns	- 0.01	ns
4-Pyridoxinsäure	+ 0.41	<0.001	+ 0.38	0.005	+ 0.26	ns
U-Zitrat	- 0.22	ns	+ 0.06	ns	+ 0.35	0.008
U-Glykolat	+ 0.05	ns	+ 0.04	ns	+ 0.27	0.040
U-Kreatinin	+ 0.11	ns	+ 0.18	ns	+ 0.30	0.024
U-Oxalat	+ 0.19	ns	+ 0.22	ns	+ 0.06	ns
B-Albumin			+ 0.10	ns	+ 0.28	0.034
B-Alkalische Phosphatase			- 0.27	0.039	- 0.34	0.009
B-Glucose			- 0.29	0.027	+ 0.06	ns
B-Phosphat			+ 0.33	0.013	+ 0.38	0.004
U-Kalzium			+ 0.32	0.015	+ 0.11	ns
U-Magnesium			+ 0.29	0.028	+ 0.20	ns

\*Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman.

In Abbildung 17 sind die Korrelationen zwischen dem Pyridoxal 5'-Phosphat und dem B-Phosphat bzw. der B-Alkalischen Phosphatase dargestellt. Bei den Steinpatienten war das Pyridoxal 5'-Phosphat mit dem B-Phosphat positiv und mit der B-Alkalischen Phosphatase negativ korreliert.

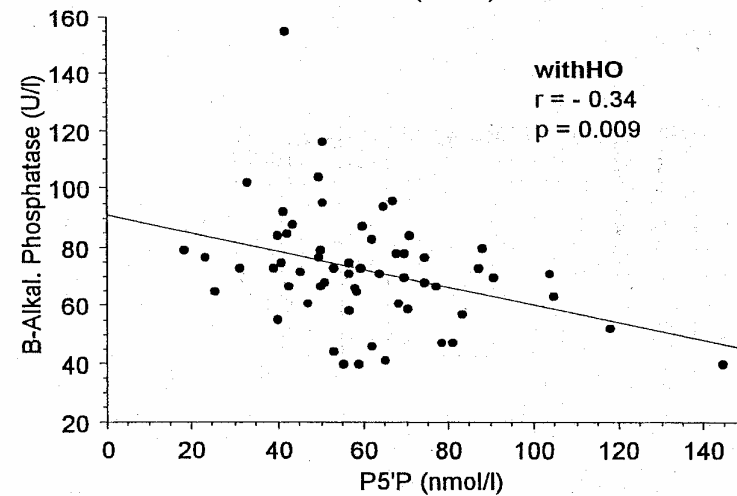
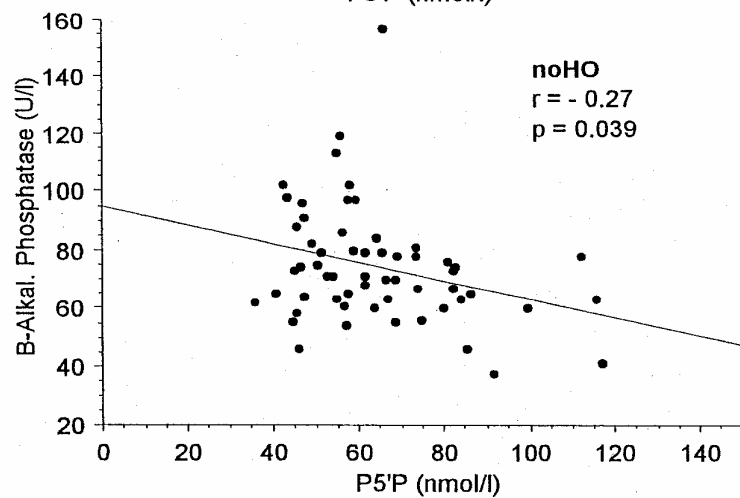
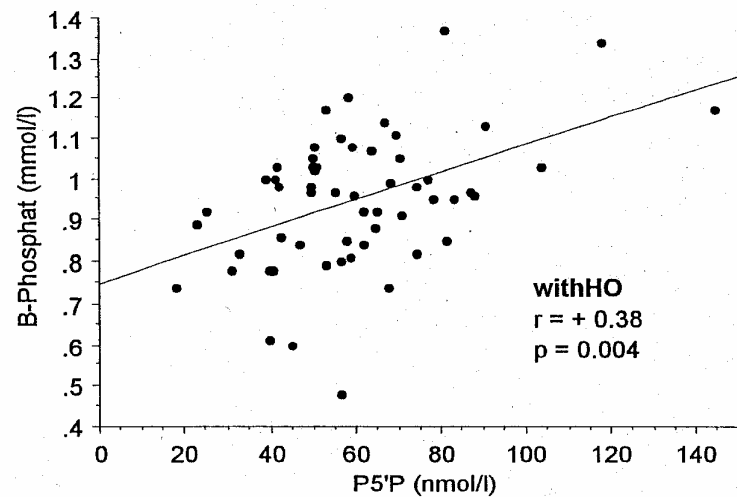
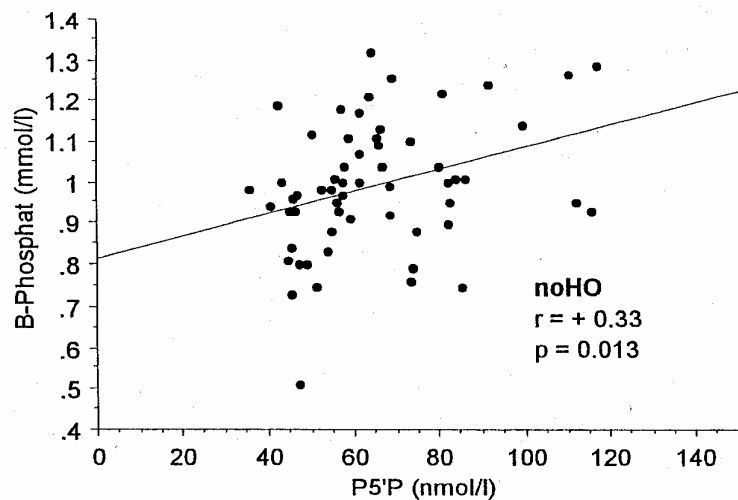


Abbildung 17: Korrelationen zwischen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat und B-Phosphat bzw. B-Alkalischen Phosphatase bei Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter freier Diät

## 4.3 URIN- UND BLUTPARAMETER VON PROBANDEN UND NIEREN-STEINPATIENTEN NACH VITAMIN-B6-BELASTUNG

### 4.3.1 Vergleich der drei Gruppen

Die Urin- und Blutparameter sowie die Charakteristik der Probanden und Nierensteinpatienten sind in der Tabelle 15 dargestellt.

Die beiden Steingruppen unterschieden sich nach der Vitamin-B6-Belastung nur in der Änderung des Urin-pH's.

In Abbildung 18 ist die Ausscheidung der 4-Pyridoxinsäure sowie die Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat dargestellt.

Nach der Vitamin-B6-Belastung hatten sowohl die Nierensteinpatienten als auch die gesunden Freiwilligen eine vergleichbare Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure und auch für  $\Delta$ 4-Pyridoxinsäure wurde zwischen den drei Gruppen kein Unterschied festgestellt.

Im Gegensatz dazu waren die Serumkonzentrationen an Pyridoxal 5'-Phosphat zwischen den Steinpatienten und den gesunden Männern signifikant unterschiedlich. Unter der 7tägigen Belastung stieg die Konzentration zwar bei allen Teilnehmern an, blieb jedoch bei 15 Steinpatienten (27%) tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Männer (N=50; 312-834nmol/l). 12 Steinpatienten (22%) hatten gar eine tiefere Konzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat als der tiefste Wert eines gesunden Probanden (283nmol/l).

Tabelle 15: Charakteristik, Blut- und Urinparameter von gesunden Probanden und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) nach der Vitamin-B6-Belastung\*

Parameter	Gruppe			p <sup>†</sup>		
	Probanden (N=50)	noHO (N=15)	withHO (N=40)	noHO vs. withHO	noHO vs. Probanden	withHO vs. Probanden
Alter (J)	37.4 ± 10.9	55.0 ± 8.8	50.8 ± 12.5	ns	<0.001	<0.001
Körpergewicht (kg)	75.2 ± 11.3 <sup>‡</sup>	79.7 ± 11.6 <sup>  </sup>	82.2 ± 11.6 <sup>**</sup>	ns	ns	0.003
Körpergrösse (m)	1.79 ± 0.07 <sup>‡</sup>	1.75 ± 0.06 <sup>  </sup>	1.75 ± 0.07 <sup>¶</sup>	ns	ns	0.016
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.6 ± 3.6 <sup>‡</sup>	26.2 ± 3.9 <sup>  </sup>	27.1 ± 3.9 <sup>¶</sup>	ns	0.006	<0.001
P5'P (nmol/l)	546 ± 180	429 ± 115	415 ± 180	ns	0.036	<0.001
ΔP5'P (nmol/l)	476 ± 172 <sup>§</sup>	382 ± 110 <sup>††</sup>	390 ± 182 <sup>‡‡</sup>	ns	ns	0.029
U-Glycolat (μmol/24h)	409 ± 205	427 ± 102	483 ± 196	ns	ns	ns
ΔU-Glycolat (μmol/24h)	-6 ± 168	-13 ± 112	-38 ± 119	ns	ns	ns
U-Kreatinin (μmol/24h)	13434 ± 3354	14066 ± 2685	14924 ± 3492	ns	ns	ns
ΔU-Kreatinin (μmol/24h)	-688 ± 2332	930 ± 2031	-88 ± 2483	ns	0.012	ns
U-Oxalat (μmol/24h)	412 ± 125	419 ± 103	508 ± 191	ns	ns	0.012
ΔU-Oxalat (μmol/24h)	27 ± 150	1 ± 99	7 ± 123	ns	ns	ns
U-pH	6.16 ± 0.45	5.99 ± 0.51	5.98 ± 0.36	ns	ns	0.041
ΔU-pH	-0.03 ± 0.48	-0.17 ± 0.42	0.09 ± 0.42	0.031	ns	ns
U-4PA (μmol/24h)	862 ± 323	1003 ± 226	857 ± 354	ns	ns	ns
ΔU-4PA (μmol/24h)	853 ± 323	1013 ± 239 <sup>§§</sup>	825 ± 370 <sup>   </sup>	ns	ns	ns
U-Volumen (ml/24h)	1887 ± 791	2205 ± 687	2112 ± 672	ns	ns	ns
ΔU-Volumen (ml/24h)	61 ± 822	-80 ± 429	151 ± 517	ns	ns	ns

\*Mittelwert ± Standardabweichung <sup>†</sup>Mann-Whitney U Test. <sup>‡</sup>N=47. <sup>§</sup>N=49. <sup>||</sup>N=14. <sup>¶</sup>N=38. <sup>\*\*</sup>N=39. <sup>††</sup>N=8. <sup>‡‡</sup>N=25. <sup>§§</sup>N=13. <sup>|||</sup>N=34.

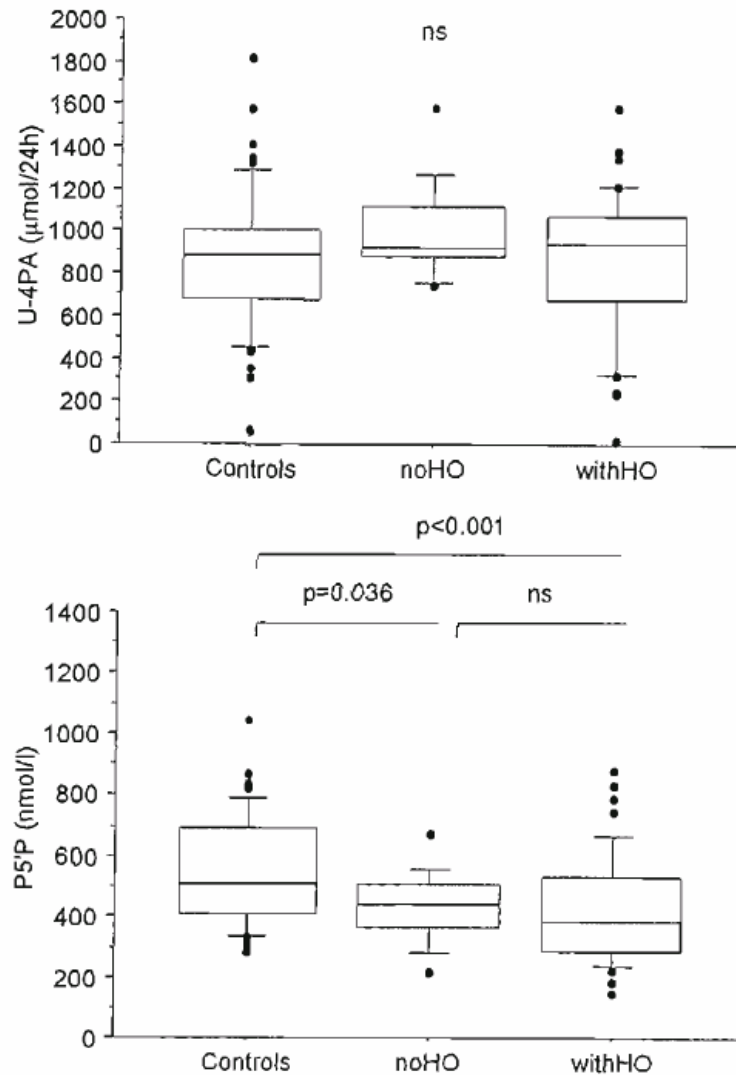


Abbildung 18: Ausscheidung der 4-Pyridoxinsäure sowie Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat von den gesunden Probanden (Controls) und von den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) nach der Vitamin-B6-Belastung

#### **4.3.2 Lineare Beziehungen von Pyridoxal 5'-Phosphat und der 4-Pyridoxinsäure**

In der Tabelle 16 sind die Korrelationskoeffizienten  $r$  und die Signifikanz  $p$  von Pyridoxal 5'-Phosphat und der 4-Pyridoxinsäure mit den bestimmten Parametern dargestellt.

Weder bei den Nierensteinpatienten noch bei den gesunden Freiwilligen wurden Korrelationen zwischen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat bzw. der Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure und dem Alter, dem Körpergewicht oder der Körpergröße gefunden.

Bei den gesunden Probanden, nicht jedoch bei den Nierensteinpatienten, wa-

ren sowohl die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat als auch  $\Delta$ Pyridoxal 5'-Phosphat mit dem U-Oxalat/U-Kreatinin-Quotienten negativ korreliert (s. Abbildung 19). Zusätzlich wurde zwischen  $\Delta$ Pyridoxal 5'-Phosphat und dem 4-Pyridoxinsäure/U-Kreatinin-Quotienten eine negative lineare Beziehung festgestellt.

Bei den Probanden und bei den Patienten ohne Hyperoxalurie war der 4-Pyridoxinsäure/U-Kreatinin-Quotient positiv mit dem U-Oxalat/U-Kreatinin-Quotienten korreliert (s. Abbildung 20).

Tabelle 16: Korrelationen von Pyridoxal 5'-Phosphat und der 4-Pyridoxinsäure mit den bestimmten Parametern. Aufgeführt sind die Korrelationskoeffizienten r und die Signifikanz p von gesunden Probanden und Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) nach der Vitamin-B6-Belastung\*

Korrelation zwischen		Gruppe					
Parameter 1	Parameter 2	Probanden		noHO		withHO	
		r	p	r	p	r	p
P5'-P	Alter	- 0.20	ns	- 0.16	ns	- 0.29	ns
	Körpergröße	+ 0.09	ns	+ 0.07	ns	- 0.20	ns
	Körpergewicht	+ 0.03	ns	- 0.50	ns	- 0.01	ns
	B-Kreatinin	+ 0.34	0.033	- 0.15	ns	+ 0.16	ns
	U-Oxalat/U-Kreatinin	- 0.30	0.037	+ 0.22	ns	+ 0.02	ns
$\Delta$ P5'-P	B-Kreatinin	+ 0.39	0.013	- 0.50	ns	+ 0.29	ns
	Kreatinin-Clearance	+ 0.05	ns	- 0.41	ns	- 0.45	0.030
	U-Kreatinin	+ 0.27	ns	- 0.76	0.044	- 0.36	ns
	U-Oxalat/U-Kreatinin	- 0.35	0.017	+ 0.12	ns	+ 0.11	ns
	4-Pyridoxinsäure/U-Kreatinin	- 0.30	0.038	+ 0.43	ns	+ 0.18	ns
4-PA	Alter	+ 0.05	ns	- 0.03	ns	- 0.07	ns
	Körpergröße	+ 0.08	ns	+ 0.00	ns	- 0.09	ns
	Körpergewicht	- 0.23	ns	- 0.50	ns	+ 0.04	ns
	B-Kreatinin	- 0.31	0.047	- 0.13	ns	+ 0.01	ns
	U-Kreatinin	+ 0.11	ns	- 0.14	ns	+ 0.39	0.015
$\Delta$ 4-PA	Kreatinin-Clearance	+ 0.35	0.025	- 0.11	ns	+ 0.32	ns
	B-Kreatinin	- 0.31	0.047	- 0.05	ns	- 0.02	ns
	U-Kreatinin	+ 0.10	ns	- 0.13	ns	+ 0.34	0.048
4-PA/U-Kreatinin	Kreatinin-Clearance	+ 0.35	0.029	- 0.08	ns	+ 0.31	ns
	B-Kreatinin	- 0.40	0.011	+ 0.07	ns	- 0.07	ns
	Kreatinin-Clearance	- 0.12	ns	- 0.53	0.047	- 0.08	ns
	U-Kreatinin	- 0.46	0.001	- 0.54	0.042	- 0.12	ns
	U-Oxalat/U-Kreatinin	+ 0.43	0.003	+ 0.58	0.030	- 0.09	ns
	U-Glykolat/U-Oxalat	- 0.38	0.008	- 0.32	ns	+ 0.22	ns

\*Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman.



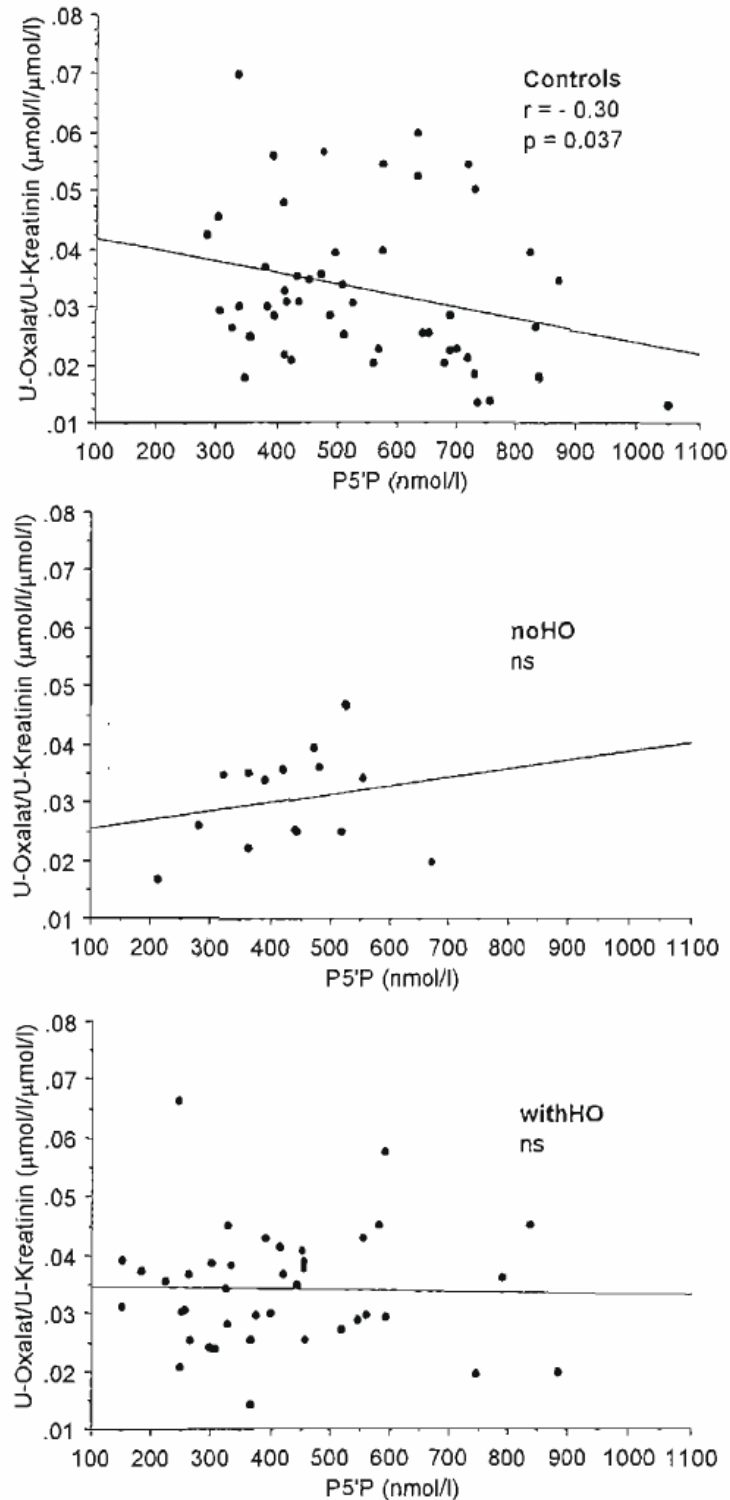


Abbildung 19: Korrelation zwischen dem U-Oxalat/U-Kreatinin-Quotienten und der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat bei den gesunden Probanden (Controls) und bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) nach der Vitamin-B6-Belastung

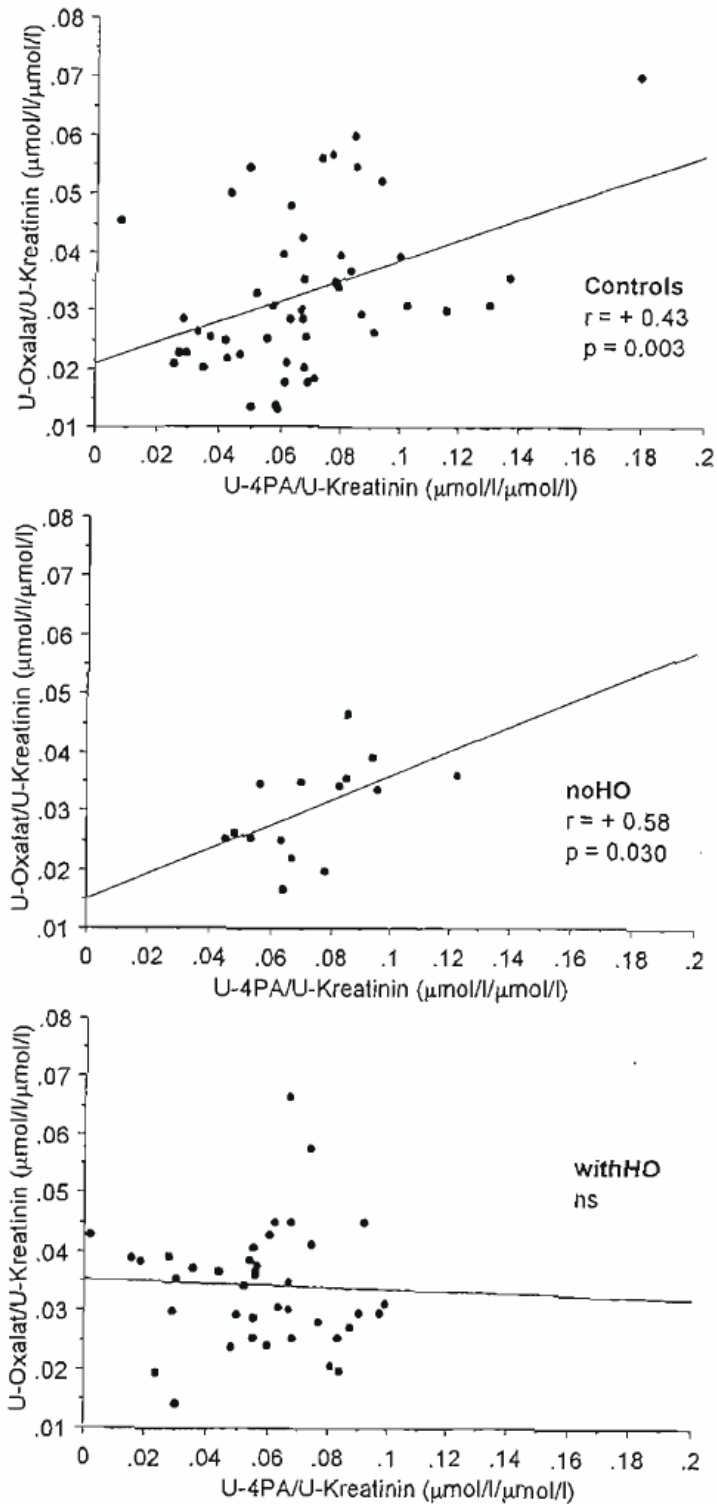


Abbildung 20: Korrelation zwischen dem U-Oxalat/U-Kreatinin- und dem U-4-Pyridoxinsäure/U-Kreatinin-Quotienten bei den gesunden Probanden (Controls) und bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) nach der Vitamin-B6-Belastung

#### **4.3.3 Oxalat- und Glykolatausscheidung vor und nach der Belastung**

In Abbildung 21 sind die individuellen Änderungen der Ausscheidung an U-Oxalat und U-Glykolat in Abhängigkeit von Tag 0 und Tag 7 dargestellt.

Unter der Vitamin-B6-Belastung änderte sich die Oxalatausscheidung bei keiner der drei Gruppen. Einzig bei den Nierensteinpatienten mit Hyperoxalurie kam es zu einem Absinken der Glykolatausscheidung.

Aus dieser Abbildung ist auch sehr gut erkennbar, wie die Ausscheidungen von Oxalat und Glykolat innert einer Woche stark variieren können.

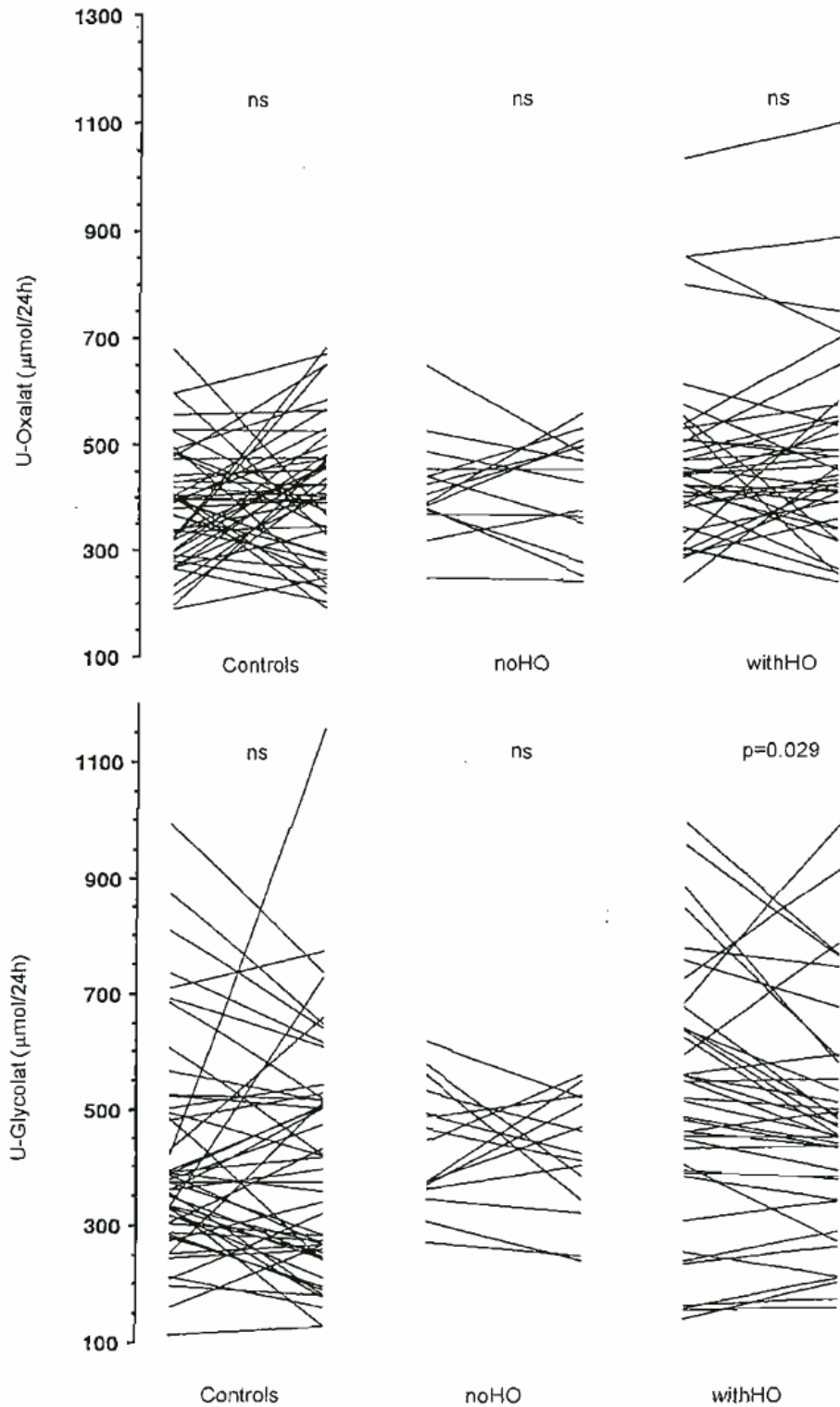


Abbildung 21: Individueller Wechsel der Oxalat- und Glykolatausscheidung bei den Probanden (Controls) und den Nierensteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie (withHO bzw. noHO) unter der Vitamin-B6-Belastung

#### 4.3.4 Unterscheidung zwischen metabolischer Hyperoxalurie und nicht metabolischer Hyperoxalurie

Die 40 Nierensteinpatienten mit Hyperoxalurie konnten in zwei Gruppen zu je 20 Patienten unterteilt werden. Die eine Gruppe bestand aus Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie (MMH; definiert als Urinausscheidung von Glykolat > Oxalat > 450µmol/24h, in mindestens 2 der 3 24h-Urine), während die andere Gruppe aus Patienten mit einer 'gewöhnlichen' Hyperoxalurie bestand (noMMH; definiert als Glykolat < Oxalat > 450µmol/24h, in mindestens 2 der 3 24h-Urine). In Tabelle 17 sind die Blut- und Urinparameter dieser beiden Gruppen nach der Vitamin-B6-Belastung zusammengefasst.

Tabelle 17: Blut- und Urinparameter von Nierensteinpatienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie und von Nierensteinpatienten mit einer 'gewöhnlichen' Hyperoxalurie (MMH bzw. noMMH) nach der Vitamin-B6-Belastung\*

Parameter	Gruppe		p <sup>†</sup>
	noMMH (N=20)	MMH (N=20)	noMMH vs. MMH
Pyridoxal 5'-Phosphat (nmol/l)	456 ± 206	374 ± 144	ns
ΔPyridoxal 5'-Phosphat (nmol/l)	468 ± 209 <sup>‡</sup>	325 ± 137 <sup>  </sup>	0.049
U-Glykolat (µmol/24h)	409 ± 187	558 ± 178	0.004
ΔU-Glykolat (µmol/24h)	-30 ± 94	-46 ± 142	ns
U-Kreatinin (µmol/24h)	14568 ± 4307	15279 ± 2493	ns
ΔU-Kreatinin (µmol/24h)	24 ± 3003	-200 ± 1900	ns
U-Oxalat (µmol/24h)	509 ± 252	507 ± 107	ns
ΔU-Oxalat (µmol/24h)	-16 ± 145	30 ± 95	ns
U-pH	5.92 ± 0.41	6.05 ± 0.29	ns
ΔU-pH	0.00 ± 0.48	0.19 ± 0.33	0.033
4-Pyridoxinsäure (µmol/24h)	866 ± 382	848 ± 334	ns
Δ4-Pyridoxinsäure (µmol/24h)	835 ± 392 <sup>§</sup>	814 ± 356 <sup>¶</sup>	ns
U-Volumen (ml/24h)	2174 ± 677	2050 ± 678	ns
ΔU-Volumen (ml/24h)	179 ± 517	123 ± 529	ns

\*Mittelwert ± Standardabweichung <sup>†</sup>Mann-Whitney U Test. <sup>‡</sup>N=11. <sup>§</sup>N=18. <sup>||</sup>N=14. <sup>¶</sup>N=16.

Bei den Nierensteinpatienten mit der geringen metabolischen Hyperoxalurie war die Ausscheidung an U-Glykolat auch nach der Vitamin-B6-Belastung höher als bei den Patienten mit der 'gewöhnlichen' Hyperoxalurie. Zusätzlich unterschieden sich die beiden Gruppen in der Änderung des U-pH's. Hingegen konnte weder für Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure noch für Δ4-Pyridoxinsäure ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In Abbildung 22 sind die Serumkonzentrationen an Pyridoxal 5'-Phosphat sowie das  $\Delta$ Pyridoxal 5'-Phosphat der beiden Gruppen dargestellt. Die Patienten mit der geringen metabolischen Hyperoxalurie hatten unter der Belastung einen kleineren Anstieg an Pyridoxal 5'-Phosphat.

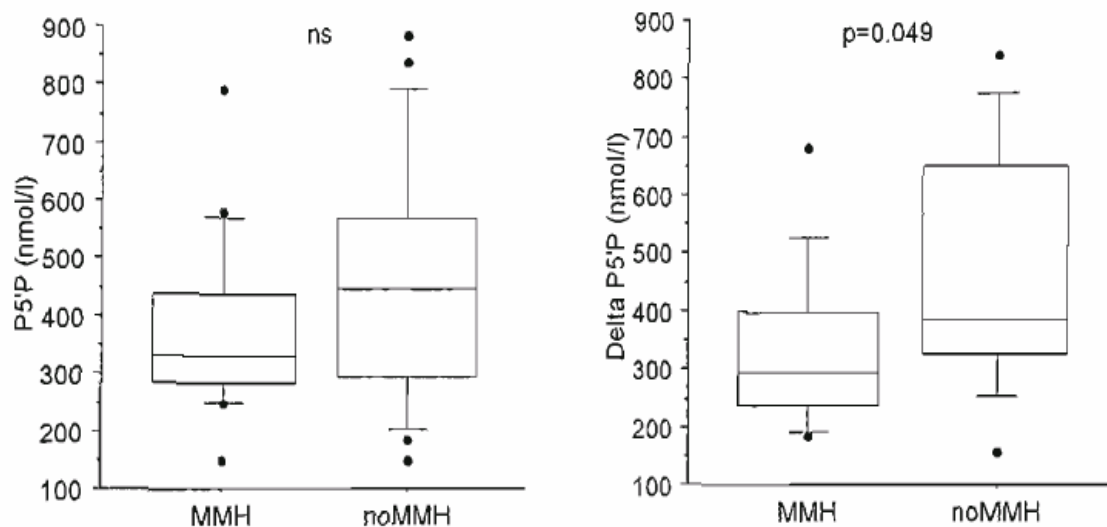


Abbildung 22: Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat sowie Delta Pyridoxal 5'-Phosphat von Nierensteinpatienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie (MMH) und von Nierensteinpatienten mit einer 'gewöhnlichen' Hyperoxalurie (noMMH) nach der Vitamin-B6-Belastung

#### 4.4 DROP-OUT'S

Während der Durchführung der Vitamin-B6-Studie waren total 8 Drop-out's zu verzeichnen.

Von den 47 eingeschlossenen Nierensteinpatienten mit Hyperoxalurie mussten nachträglich sieben Patienten ausgeschlossen werden:

- Vier Patienten wurden ausgeschlossen, weil die Einschlusskriterien nicht mehr erfüllt waren. Bei einem genauen Studium der Krankengeschichten zeigte sich, dass diese Patienten in den ersten drei 24h-Urinsammlungen jeweils nur einmal eine Hyperoxalurie hatten und nicht wie gefordert mindestens zweimal.
- Ein Patient konnte am letzten Tag aus beruflichen Gründen nicht zur Blutentnahme kommen und meldete sich ab.
- Ein Patient erkrankte während der Studie an einer schweren Infektion und wollte deshalb die Studie nicht beenden.
- Von einem Patienten konnte trotz mehreren Versuchen nur so wenig Blut entnommen werden, dass es für eine Analyse nicht reichte.

Von den 51 eingeschlossenen gesunden Freiwilligen musste ein Proband wegen schlechter Compliance ausgeschlossen werden.

Unter den Patienten ohne Hyperoxalurie gab es keine Drop-out's.

#### 4.5 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN / NEBENWIRKUNGEN

Total 21 von 105 Versuchspersonen (20.0%) haben unter der Vitamin-B6-Belastung Nebenwirkungen wahrgenommen, wobei Mehrfachnennungen möglich waren.

13 von 55 Patienten (23.6%) bemerkten die folgenden Nebenwirkungen: Durchfall (2x), Juckreiz (2x), brennende Zunge, Schweissausbruch, Kopfschmerzen, trockene Lippen, Verstopfung, Appetitabnahme, Appetitzunahme, Abnahme von Schmerzen, besser gelaunt, Euphorie, keine Mittagsmüdigkeit und mehr Energie.

Auch 8 von 50 Probanden (16.0%) haben Nebenwirkungen wahrgenommen: Durchfall (2x), innere Unruhe nach Einnahme der Tabletten, Schwarzwerden vor den Augen, tieferer Blutdruck, weniger Schlaf und dadurch bedingt überdurchschnittliche Müdigkeit, Abnahme von Schmerzen, fühlte sich besser sowie Euphorie.

#### 5 DISKUSSION

Zahlreiche Studien in den vergangenen Jahren haben gezeigt, dass Pyridoxin sowohl im Tierexperiment [Schneider 1977, Kridl 1984] als auch beim Menschen [Revúsová 1978, Murthy 1982, Balcke 1983, Mitwalli 1988] mit Erfolg bei Hyperoxalurie angewendet werden kann. Leider gibt es auch Studien, bei denen die Teilnehmer keine Erniedrigung der Oxalatausscheidung [Tiselius 1977b, Edwards 1990] oder gar ein Ansteigen der Oxalurie zeigten [Edwards 1990]. Es wurden auch drei Fälle einer geringen metabolischen Hyperoxalurie beschrieben, bei denen jeder dieser drei Patienten ein anderes Verhalten auf Pyridoxin zeigte [Gill 1986]. Der biochemische Grund dieses unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Pyridoxin ist nicht bekannt.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Mehrzahl der Patienten mit einem idiopathischen Nierensteinleiden eine adequate Aufnahme und Absorption von Vitamin B6 hat. Sowohl vor als auch nach der B6-Belastung wurden zwischen den drei untersuchten Gruppen, Probanden, Patienten ohne und Patienten mit Hyperoxalurie, für die Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure keine signifikanten Unterschiede gefunden. Diese Resultate bestätigen somit Befunde aus früheren Jahren, in denen die 4-Pyridoxinsäure-Ausscheidung bei Nierensteinpatienten nicht kleiner war als bei gesunden Freiwilligen [Tiselius 1977a, Edwards 1990, Edwards 1991].

Wurden hingegen die Serumkonzentrationen von Pyridoxal 5'-Phosphat der gesunden Probanden und der Nierensteinpatienten miteinander verglichen, zeigte sich ein anderes Bild. Basal war das Pyridoxal 5'-Phosphat bei den Patienten ohne Hyperoxalurie niedriger als bei den Probanden, aber höher als bei den Patienten mit Hyperoxalurie. Die Unterschiede für das Pyridoxal 5'-

Phosphat zwischen den idiopathischen Kalziumsteinpatienten und den Probanden waren signifikant. Bei 38% der Patienten mit Hyperoxalurie und bei 25% der Patienten ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden. Erwartungsgemäss kam es bei allen drei Gruppen unter der Vitamin-B6-Belastung zu einem signifikanten Ansteigen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat, blieb jedoch bei 13% der Patienten ohne Hyperoxalurie und bei 33% der Patienten mit Hyperoxalurie tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden. Die Unterschiede für Pyridoxal 5'-Phosphat zwischen den idiopathischen Kalziumsteinpatienten und den Probanden waren ebenfalls signifikant.

Bis heute ist lediglich eine Studie bekannt, in der die Konzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat im Plasma von Nierensteinpatienten gemessen wurde. 1991 erhielten gesunde Freiwillige, 7 Patienten mit einer primären Hyperoxalurie vom Typ I und 8 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie unterschiedliche Dosen an Pyridoxin [Edwards 1991]. Die Konzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat schien bei den Patienten mit einer primären Hyperoxalurie niedriger als bei den gesunden Freiwilligen ( $p=0.178$ ). Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie hatten eine signifikant niedrigere Konzentration als die Gesunden. Die Autoren schlossen aus ihren Resultaten, dass bei einer geringen metabolischen Hyperoxalurie Schwierigkeiten in der Umwandlung von Pyridoxin in Pyridoxal 5'-Phosphat bestehen könnten.

Die Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie in der vorliegenden Studie hatten nach der B6-Belastung im Mittel eine tiefere Konzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat als die Patienten ohne geringe metabolische Hyperoxalurie. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Befunde von Edwards, gehen jedoch noch weiter, da nicht nur Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie von einer Aktivierungsstörung des Vitamins B6 betroffen waren, sondern, wie oben gezeigt, auch Kalziumsteinpatienten ohne Hyperoxalurie und "normale" Patienten mit Hyperoxalurie.

Bei 15 Patienten blieb nach der B6-Belastung die Konzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden. Die Frage nach der Compliance dieser Teilnehmer ist berechtigt. Sie konnte jedoch überprüft werden mittels der Messung der 4-Pyridoxinsäure. 14 dieser 15 Patienten hatten eine Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure, die innerhalb des Referenzbereichs der gesunden Probanden lag. Lediglich ein Kalziumsteinpatient hatte eine tiefere Ausscheidung, die jedoch immer noch höher war als der tiefste Wert eines gesunden Probanden.

Unter der B6-Belastung änderte sich bei keiner Gruppe die Oxalatausscheidung signifikant, und nur bei den Patienten mit Hyperoxalurie kam es zu einem signifikanten Absinken der Glykolatausscheidung. Zahlreiche Autoren haben von einer Erniedrigung der Oxalatausscheidung berichtet [Revúsová 1978, Murthy 1982, Balcke 1983, Mitwalli 1988]. Andere stellten keine signifikante Veränderung oder sogar eine Erhöhung unter B6-Belastung fest [Edwards 1990]. Die Gründe für diese unterschiedlichen Befunde sind vielfältig, u.a. unterschiedliche Dauer der Pyridoxinsupplementation, unterschiedliche Dosen, inhomogenes Patientenkollektiv und keine Oxalatrestriktion bzw. standardisierte Diät während der Belastung.



Die Gruppe der Steinpatienten war im Mittel älter, kleiner, schwerer und dicker als die gesunde Kontrollpopulation. Dies sollte aber nicht stören, da für die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat weder in der Kontrollgruppe noch bei den Steinbildnern signifikante Korrelationen zu Alter, Körpergrösse oder Körpergewicht gefunden wurden.

In der Literatur sind Probleme mit der Stabilität der B6-Vitameren bekannt und auch genauer untersucht worden [Anderson 1974, Davis 1974a, Ang 1979, Ubbink 1985, Shephard 1986]. Dem Erhalt der vollen Aktivität von Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure und somit der Sicherstellung der Stabilität während der Durchführung der Studie wurde eine hohe Priorität beigemessen. Da während der Studie die Seren und die Urine der gesunden Probanden wie auch der Nierensteinpatienten parallel und somit gleichzeitig gesammelt, gleich verarbeitet, gelagert und analysiert wurden, kann eine diesbezügliche Interferenz ausgeschlossen werden.

Die Auswirkungen von Pyridoxin auf die Oxalatausscheidung bleiben kontrovers. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie kann gesagt werden, dass Nierensteinpatienten mit einem idiopathischen Kalziumsteinleiden eine mit gesunden Probanden vergleichbare Einnahme und Absorption an Vitamin B6 haben. Dass aber auch bei mehr als einem Drittel der Patienten mit Hyperoxalurie und bei einem Viertel der Patienten ohne Hyperoxalurie eine gestörte Aktivierung von Pyridoxin vorhanden ist, die ev. sogar massgeblich an der Ausbildung dieses Krankheitsbildes beteiligt ist.

## 4.3 Proteinbelastung von Nierensteinpatienten und gesunden Freiwilligen

### 1 ZUSAMMENFASSUNG

Eine hohe Proteinzufuhr ist ein anerkannter Risikofaktor des Nierensteinleidens. Die vorliegende Studie wurde entworfen, um bei idiopathischen Kalziumsteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie und bei gesunden Kontrollpersonen zu testen, ob eine proteinreiche Kost die Oxalatausscheidung im Urin beeinflusst.

12 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie, 8 Patienten ohne Hyperoxalurie und 13 gesunde Männer wurden unter zwei Diäten studiert, zuerst unter einer 5tägigen Kost mit einer mässigen Proteinzufuhr, gefolgt von einer 5tägigen Kost mit viel Fleischprotein. In beiden Diäten wurden sowohl oxalatreiche Nahrungsmittel, künstlicher Süsstoff und Vitamin-C-enthaltende Arzneimittel vermieden. Die Oxalatausscheidung im 24h-Urin zusammen mit den Markern der Proteinzufuhr, wie Harnstoff, Phosphat, Harnsäure und Sulfat, wurden am letzten Tag jeder Periode gemessen.

Die proteinreiche Kost bewirkte eine Zunahme der Oxalurie bei 7 der 20 Steinpatienten, jedoch bei keiner der gesunden Kontrollpersonen. Falls die Gruppe von 20 Männern als repräsentativ für Steinpatienten im allgemeinen wären, dürfte geschlossen werden, dass etwa ein Drittel der idiopathischen Kalziumsteinpatienten auf proteinreiche Kost mit einer Zunahme der Oxalurie reagieren.

Aus diesem Grund wird eine standardisierte Proteinbelastung vorgeschlagen, um diejenigen Patienten zu identifizieren, bei welchen durch eine Fleischproteinrestriktion das Risiko eines Steinrezidivs durch Reduktion der Oxalurie erniedrigt werden könnte.

### 2 EINLEITUNG

Ein Zusammenhang zwischen Diätfaktoren und Nephrolithiasis wurde zuerst durch Andersen 1968 vermutet und seither durch verschiedene Studien bestätigt [Robertson 1978b, Boyce 1979, Ljunghall 1979, Robertson 1980]. So beobachteten verschiedene Autoren eine starke Korrelation zwischen der Einnahme von tierischem Protein und dem Auftreten von Nierensteinen [Coe 1976, Robertson 1978a, Trinchieri 1991, Curhan 1993]. Während es allgemein anerkannt ist, dass ein Exzess an Protein zu einer erhöhten Ausscheidung an lithogenen Substanzen, wie z.B. Kalzium [Robertson 1979, Fellstrom 1984, Wasserstein 1987] und Harnsäure [Robertson 1979, Breslau 1988], und zu einem Absinken der Zitratausscheidung führt, bleibt die Rolle der Einnahme an tierischem Protein auf die Oxalatausscheidung kontrovers. In einigen Interventionsstudien mit Proteinbelastung wurde ein Ansteigen der Oxalatausscheidung [Robertson 1979, Urivetzky 1990], kein Ansteigen [Fellstrom 1984, Urivetzky 1987] oder ein Ansteigen nur bei gesunden Frauen beobachtet [Holmes 1993].

Eine vergleichbare Diskrepanz wurde unter Proteinrestriktion gefunden [Marangella 1989, Giannini 1999]. Die Kontroverse kann an der Tatsache liegen, dass die studierten Populationen heterogen waren und verschiedene Typen von Nierensteinpatienten und gesunden Personen einschlossen.

Aus diesen Gründen wurde die Hypothese formuliert, dass, was die Oxalatausscheidung betrifft, nur spezifische Gruppen von Nierensteinpatienten, z.B. Patienten mit einer sogenannten geringen metabolischen Hyperoxalurie, sensitiv gegenüber Fleischprotein sein könnten. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um diese Hypothese zu testen. Es handelt sich um eine Interventionsstudie, um den Effekt einer Fleischproteinbelastung auf das Urinoxalat bei drei Gruppen von Teilnehmern, gesunden Kontrollen und idiopathischen Kalziumsteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie, zu vergleichen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 AUSWAHL DER PATIENTEN UND PROBANDEN

---

Von 191 männlichen Nierensteinpatienten, die zwischen Januar 1993 und Dezember 1998 an der Medizinischen Universitätspoliklinik des Inselspitals untersucht wurden, konnten 73 rezidivierende, idiopathische Kalziumsteinpatienten (ICSF; definiert als Patienten mit infrarotspektroskopisch dokumentierten, kalziumhaltigen Nierensteinen) aufgrund von 3 aufeinanderfolgenden 24h-Urinsammlungen als potentielle Kandidaten identifiziert werden. 43 idiopathische Kalziumsteinpatienten hatten eine geringe metabolische Hyperoxalurie (MMH; definiert als Urinausscheidung von Glykolat > Oxalat > 450µmol/24h, in mindestens 2 der 3 24h-Urine), und 30 idiopathische Kalziumsteinpatienten hatten eine normale Oxalurie (noHO; definiert als Urinausscheidung von Oxalat < 450µmol/24h in allen 3 24h-Urinsammlungen). Die betreffenden Patienten wurden schriftlich eingeladen, an der Studie teilzunehmen. Mittels Zeitungsinseraten wurden gesunde Männer als Kontrollpersonen gesucht. Die Studie wurde zwischen Dezember 1998 und April 1999 durchgeführt.

Potentielle Ursachen von Nephrolithiasis, wie primärer Hyperparathyreoidismus, renal tubuläre Azidose, entzündliche Darmerkrankungen, Markschwammnieren, Sarkoidose, Vitamin-D-Intoxikation, Infektionen des Urintraktes wurden vor der Teilnahme ausgeschlossen. Zusätzliches Ausschlusskriterium für die gesunden Kontrollen waren ein früherer Nierenstein.

21 Nierensteinpatienten, d.h. 13 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie und 8 Patienten ohne Hyperoxalurie, sowie 13 gesunde Männer erklärten sich bereit, freiwillig an der Studie teilzunehmen. 1 Patient mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie zog sich vor Beginn der Studie wegen unspezifischer Abdominalbeschwerden zurück.

Alle Teilnehmer waren in guter körperlicher Verfassung. Alle gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, welche durch die Kommission für medizinisch-ethische Fragen der Fakultät Bern überprüft und bewilligt worden war.

### **3.2 DURCHFÜHRUNG DER PROTEINBELASTUNG**

Ausgehend von ihrer gewohnten Kost erhielten alle Teilnehmer in einer ersten Phase während 5 Tagen eine sogenannte ideale Kost (alters- und aktivitätsangepasste Kalorienzufuhr mit 55% Kohlenhydrate, 30% Fette und 15% Proteine), wonach eine erste 24h-Urinsammlung durchgeführt wurde. In einer zweiten Phase wurde eine Proteinbelastung durchgeführt, indem alle Teilnehmer während 5 Tagen eine isokalorische, proteinreiche Kost (35% der gesamten Kalorienzufuhr) einnahmen. Danach erfolgte erneut eine 24h-Urinsammlung. Beide Diäten wurden von einer diplomierten Ernährungsberaterin zusammengestellt und enthielten vergleichbare Mengen an Kalzium und Oxalat. Während der ganzen Testperiode waren die Teilnehmer angehalten, auf Vitamin-C-haltige Arzneimittel und künstliche Süsstoffe zu verzichten und genügend zu trinken, um auf ein Urinvolumen von mindestens 2000ml zu kommen. Die beiden Diäten waren so zusammengesetzt, dass sie zu Hause eingenommen werden konnten, und die dazu nötigen Instruktionen wurden sowohl mündlich als auch schriftlich abgegeben (siehe Anhang 7.1). Während der ganzen Studie wurde von den Teilnehmern ein Tagebuch geführt, einerseits um die Compliance sicherzustellen und andererseits um die Studie mittels PRODI 4.4, einer Software, entwickelt von der Sektion Ernährung und Diät, Departement Medizin, Universität Freiburg, Deutschland, auswerten zu können. Mit Hilfe der Eintragungen in den Tagebüchern konnte die genaue Zusammensetzung der beiden Diäten bestimmt werden.

### **3.3 BEURTEILUNGSPARAMETER**

#### **3.3.1 Probensammlung und -aufbereitung**

Alle Teilnehmer sammelten am letzten Tag jeder Phase einen 24h-Urin (von 06 Uhr am Morgen bis um 06 Uhr am nächsten Tag). Dazu wurden Plastikflaschen von 3.3 Liter Inhalt verwendet, die 10g Borsäure als Konservierungstoff enthielten. Nüchternblutproben wurden am Ende der Studie entnommen.

#### **3.3.2 Analysenmethoden**

Oxalat wurde im Kalzium-Phosphat-Labor des Inselspitals mittels einer Oxalat-oxidase-Methode bestimmt [Chiriboga 1963]. Gemäss unseren Messungen beträgt der mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizient für Oxalat 8.5%. Glykolat wurde mittels Glykolsäureoxidase [Kasidas 1979], Zitrat mittels Zitratlyase [Toftegaard-Nielsen 1976] und Sulfat mittels HPLC bestimmt. Harnstoff, Kalzium, Phosphat, Magnesium, Natrium, Kalium, Chlorid und Harnsäure wurden mittels Autoanalyser-Technik im Chemischen Zentrallabor gemessen. Die Vitamin-B6-Metaboliten wurden im Serum (P5'P) und im 24h-Urin (U-4PA) mittels HPLC quantitativ erfasst.

### **3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Gruppenunterschiede zu Beginn der Studie wurden mittels nichtparametrischer Tests oder mittels ANOVA untersucht, in Abhängigkeit von der jeweiligen Verteilung. Bei den statistischen Analysen der Variation der Oxalatausscheidung wurde

der Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV) der Oxalatkonzentration (Conz) und das Urinvolumen (V) in Betracht gezogen. Um ein Ansteigen der Oxalatausscheidung nach der Proteinbelastung als signifikant ( $p < 0.05$ ) zu akzeptieren, musste die niedrige Schätzung des zweiten Wertes  $\{Conz_2 \times V_2 \times (100\% - 1.4 \times CV)\}$  grösser sein als die hohe Schätzung des ersten Wertes  $\{Conz_1 \times V_1 \times (100\% + 1.4 \times CV)\}$ .

## 4 ERGEBNISSE

Tabelle 19 fasst die basalen Charakteristiken aller Teilnehmer zusammen. Zwischen den drei Gruppen wurden keine Unterschiede bezüglich Alter und BMI festgestellt.

Tabelle 19: Charakteristik der gesunden Probanden und Nierensteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie (MMH bzw. noHO)\*

Parameter	Gruppe			
	Probanden (N=13)	Alle Patienten (N=20)	MMH (N=12)	noHO (N=8)
Alter (J)	53.2 ± 8.7	54.3 ± 9.6	52.8 ± 10.8	56.5 ± 7.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.6 ± 2.9	26.8 ± 3.4	27.7 ± 3.7	25.5 ± 2.4
Steinabgänge (Anzahl/Person)	0	4.8 ± 4.7 <sup>†</sup>	5.3 ± 5.6 <sup>†</sup>	4.0 ± 3.0 <sup>†</sup>

\*Mittelwert ± Standardabweichung. <sup>†</sup> $p < 0.0001$  vs. Probanden

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der beiden Diäten berechnet anhand der Aufzeichnungen in den Tagebüchern der Teilnehmer. Zwischen den drei Gruppen wurden für die totale Energiezufuhr, den Prozentsatz der Proteinenergie, Kohlenhydrate, Fett, Kalzium und Vitamin-B6-Aufnahme weder in der idealen Kost noch in der proteinreichen Kost Unterschiede festgestellt. Die Proteinzufuhr war während der proteinreichen Kost bei den Patienten ohne Hyperoxalurie leicht niedriger als bei den Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie. Während der idealen Kost war die Vitamin-C-Zufuhr bei den Kontrollen grösser als bei den idiopathischen Kalziumsteinpatienten. Während der proteinreichen Phase assen die Versuchspersonen aller 3 Gruppen etwas grössere Mengen an Fett und Vitamin B6, jedoch etwas weniger Kohlenhydrate als vorgesehen, was in höherer Energiezufuhr resultierte.

Abbildung 23 zeigt die Änderung der Oxalatausscheidung bei den drei Gruppen. Bei den Kontrollen und bei den Patienten ohne Hyperoxalurie wurde keine signifikante Änderung beobachtet. Bei den Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie hingegen kam es zu einem signifikanten Ansteigen der Oxalatausscheidung im Urin.

Es muss herausgestrichen werden, dass unter der idealen Kost 9 von 13 Kontrollpersonen und 2 von 8 Patienten ohne Hyperoxalurie eine 24h-Oxalurie

über dem Referenzbereich hatten, während 4 von 12 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie eine normale Oxalurie aufwiesen.

Tabelle 21 fasst andere Urinparameter zusammen: Unter der idealen Kost waren das Kalzium und das Phosphat signifikant höher bei den Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie als bei den Kontrollen und bei den Patienten ohne Hyperoxalurie. Wie erwartet, war das Glykolat höher bei den Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie als bei den Kontrollen. Unter der proteinreichen Kost stiegen Harnstoff, Harnsäure, Phosphat und Glykolat bei allen Gruppen ähnlich an. Gleichzeitig war ein abfallender Trend des Zitrats zu beobachten.

Die Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat war bei allen Teilnehmern normal sowohl zu Beginn als auch am Ende der Studie (Referenzbereich: 50-142nmol/l). Das Pyridoxal 5'-Phosphat erhöhte sich während der Studie innerhalb des Referenzbereichs ( $p=0.003$ ), jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Kontrollen: von  $96\pm34$  auf  $124\pm31$ nmol/l, MMH: von  $98\pm37$  auf  $120\pm44$ nmol/l, ICSF: von  $89\pm24$  auf  $112\pm31$ nmol/l).

Abbildung 24 zeigt die individuellen Werte von Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure. Die Teilnehmer mit den tiefsten 4 Serumkonzentrationen an Pyridoxal 5'-Phosphat und den tiefsten 5 Ausscheidungen an 4-Pyridoxinsäure waren alles Nierensteinpatienten.

Bei den Kalziumsteinpatienten wurde eine positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat und der Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure gefunden; dies war bei den gesunden Kontrollen nicht der Fall (s. Abbildung 25). Andererseits wurde nur bei den gesunden Kontrollpersonen eine stark negative Korrelation zwischen der Oxalurie und der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat gefunden nicht jedoch bei den Kalziumsteinpatienten (s. Abbildung 26).

Tabelle 20: Zusammensetzung der beiden Diäten, ideale Kost (MPD) und proteinreiche Kost (HPD), der gesunden Probanden und der Nierensteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie (MMH bzw. noHO)

Nährstoffaufnahme	Diät	Gruppe			
		Probanden (N=13)	Alle Patienten (N=20)	MMH (N=12)	noHO (N=8)
Protein (g/24h)	MPD	75 ± 14	81 ± 13	84 ± 13	77 ± 12
	HPD	184 ± 31 <sup>†</sup>	191 ± 29 <sup>†</sup>	201 ± 27 <sup>†</sup>	172 ± 20 <sup>†II</sup>
Proteinenergie/Totale Energie (%)	MPD	16.4 ± 2.3	16.7 ± 2.1	16.5 ± 2.6	16.4 ± 1.0
	HPD	31.5 ± 5.2 <sup>†</sup>	30.5 ± 3.4 <sup>†</sup>	31.2 ± 3.6 <sup>†</sup>	29.3 ± 3.0 <sup>†</sup>
Fett (g/24h)	MPD	57 ± 8	64 ± 17	64 ± 16	63 ± 19
	HPD	90 ± 21 <sup>†</sup>	95 ± 13 <sup>†</sup>	96 ± 15 <sup>†</sup>	93 ± 10 <sup>†</sup>
Kohlenhydrate (g/24h)	MPD	250 ± 59	265 ± 71	273 ± 77	251 ± 57
	HPD	209 ± 81 <sup>†</sup>	217 ± 55 <sup>†</sup>	227 ± 53 <sup>†</sup>	200 ± 57
Energie/Körpergewicht (KCal/kg)	MPD	23 ± 3	25 ± 5	25 ± 6	25 ± 5
	HPD	31 ± 6 <sup>†</sup>	32 ± 5 <sup>†</sup>	32 ± 6 <sup>†</sup>	32 ± 4 <sup>†</sup>
Kalzium (mg/24h)	MPD	1028 ± 317	1245 ± 443	1336 ± 525	1090 ± 192
	HPD	1185 ± 481	1312 ± 560 <sup>†</sup>	1331 ± 582	1279 ± 562
Vitamin C (mg/24h)	MPD	198 ± 155	115 ± 64 <sup>‡</sup>	124 ± 70	100 ± 54
	HPD	137 ± 69	107 ± 57	121 ± 55	82 ± 56
Vitamin B6 (mg/24h)	MPD	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.3 ± 0.4
	HPD	2.9 ± 0.5 <sup>†</sup>	2.9 ± 0.8 <sup>†</sup>	3.1 ± 0.9 <sup>†</sup>	2.7 ± 0.8 <sup>†</sup>

\*Mittelwert ± Standardabweichung von 5 Tagen. <sup>†</sup>signifikant vs. MPD. <sup>‡</sup>signifikant vs. Probanden. <sup>II</sup>signifikant vs. MMH.

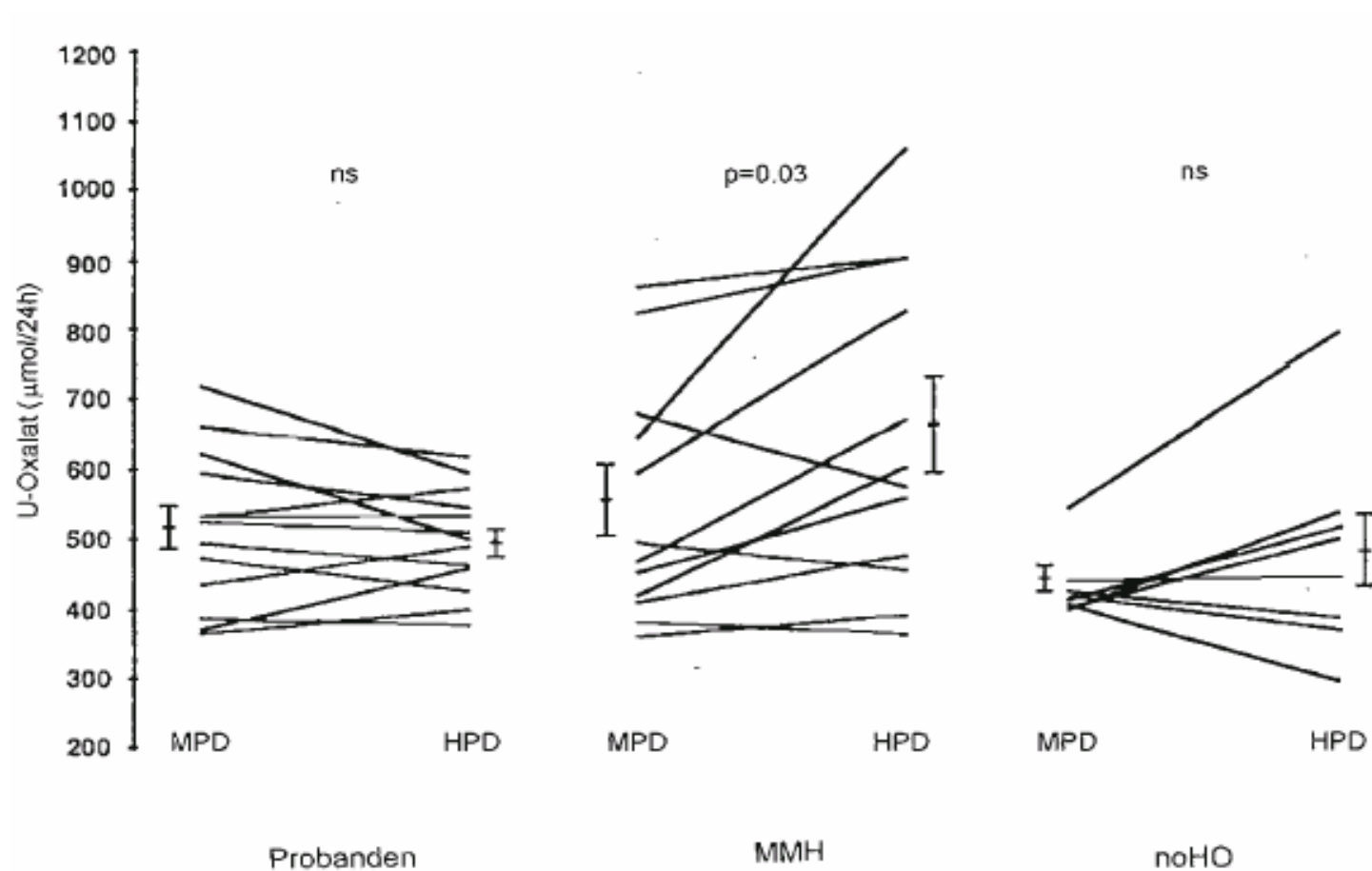


Abbildung 23: Individuelle Änderung der Oxalatausscheidung der gesunden Probanden und der Nierensteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie (MMH bzw. noHO) unter der idealen Kost (MPD) verglichen mit der proteinreichen Kost (HPD)



Tabelle 21: Änderungen von weiteren Urinparametern beim Wechsel von der idealen Kost (MPD) zur proteinreichen Kost (HPD) bei den gesunden Probanden und bei den Nierensteinpatienten mit oder ohne geringe metabolische Hyperoxalurie (MMH bzw. noHO)\*

Urinparameter	Diät	Gruppe			
		Probanden (N=13)	Alle Patienten (N=20)	MMH (N=12)	noHO (N=8)
Glykolat (µmol/24h)	MPD	499 ± 154	576 ± 168	633 ± 160 <sup>†</sup>	490 ± 149
	HPD	804 ± 250 <sup>†</sup>	883 ± 30 <sup>†</sup>	991 ± 288 <sup>†</sup>	721 ± 255 <sup>†  </sup>
Harnstoff (mmol/24h)	MPD	452 ± 101	494 ± 119	533 ± 124	435 ± 86
	HPD	851 ± 176 <sup>†</sup>	813 ± 203 <sup>†</sup>	885 ± 139 <sup>†</sup>	706 ± 244 <sup>†  </sup>
Kalzium (mmol/24h)	MPD	5.6 ± 3.7	8.7 ± 4.0 <sup>†</sup>	10.7 ± 3.7 <sup>†</sup>	5.7 ± 1.9 <sup>  </sup>
	HPD	6.1 ± 3.6	10.0 ± 5.5 <sup>††</sup>	12.0 ± 5.7 <sup>†</sup>	7.1 ± 3.8 <sup>  </sup>
Natrium (mmol/24h)	MPD	210 ± 49	216 ± 67	237 ± 66	186 ± 60
	HPD	276 ± 87 <sup>†</sup>	271 ± 71 <sup>†</sup>	285 ± 63 <sup>†</sup>	250 ± 80 <sup>†</sup>
Sulfat (mmol/24h)	MPD	23.5 ± 7.7	25.5 ± 9.9	28.5 ± 11.0	21.0 ± 5.8
	HPD	43.0 ± 9.0 <sup>†</sup>	39.6 ± 13.9 <sup>†</sup>	44.0 ± 14.7 <sup>†</sup>	33.0 ± 10.3 <sup>†  </sup>
Phosphat (mmol/24h)	MPD	32.3 ± 10.3	37.6 ± 10.6	41.8 ± 10.9 <sup>†</sup>	31.2 ± 6.7 <sup>  </sup>
	HPD	45.4 ± 15.7 <sup>†</sup>	47.2 ± 12.6 <sup>†</sup>	51.5 ± 12.3 <sup>†</sup>	40.8 ± 10.8 <sup>†</sup>
Harnsäure (mmol/24h)	MPD	4297 ± 963	3901 ± 741	4192 ± 721	3464 ± 557 <sup>†</sup>
	HPD	6557 ± 1797 <sup>†</sup>	6093 ± 1448 <sup>†</sup>	6739 ± 1052 <sup>†</sup>	5123 ± 1470 <sup>†  </sup>
Zitrat (mmol/24h)	MPD	825 ± 273	820 ± 272	850 ± 267	775 ± 291
	HPD	781 ± 259	724 ± 272 <sup>†</sup>	766 ± 226 <sup>†</sup>	660 ± 336
Magnesium (mmol/24h)	MPD	6.5 ± 1.6	6.7 ± 2.3	7.5 ± 2.1	5.4 ± 2.0 <sup>  </sup>
	HPD	6.3 ± 1.7	6.8 ± 2.8	7.7 ± 3.0	5.6 ± 2.2
4-Pyridoxinsäure (µmol/24h)	MPD	10.1 ± 3.4	9.7 ± 4.8	9.6 ± 3.9	9.9 ± 6.2
	HPD	13.3 ± 3.8 <sup>†</sup>	11.3 ± 4.1	12.0 ± 4.0	10.3 ± 4.2
Urinvolumen (ml/24h)	MPD	3069 ± 584	2698 ± 989	3142 ± 884	2031 ± 762 <sup>†  </sup>
	HPD	3208 ± 515	2940 ± 1165	3425 ± 1141	2213 ± 792 <sup>†  </sup>

\*Mittelwert ± Standardabweichung von 5 Tagen. <sup>†</sup>signifikant vs. MPD. <sup>†</sup>signifikant vs. Probanden. <sup>||</sup>signifikant vs. MMH.

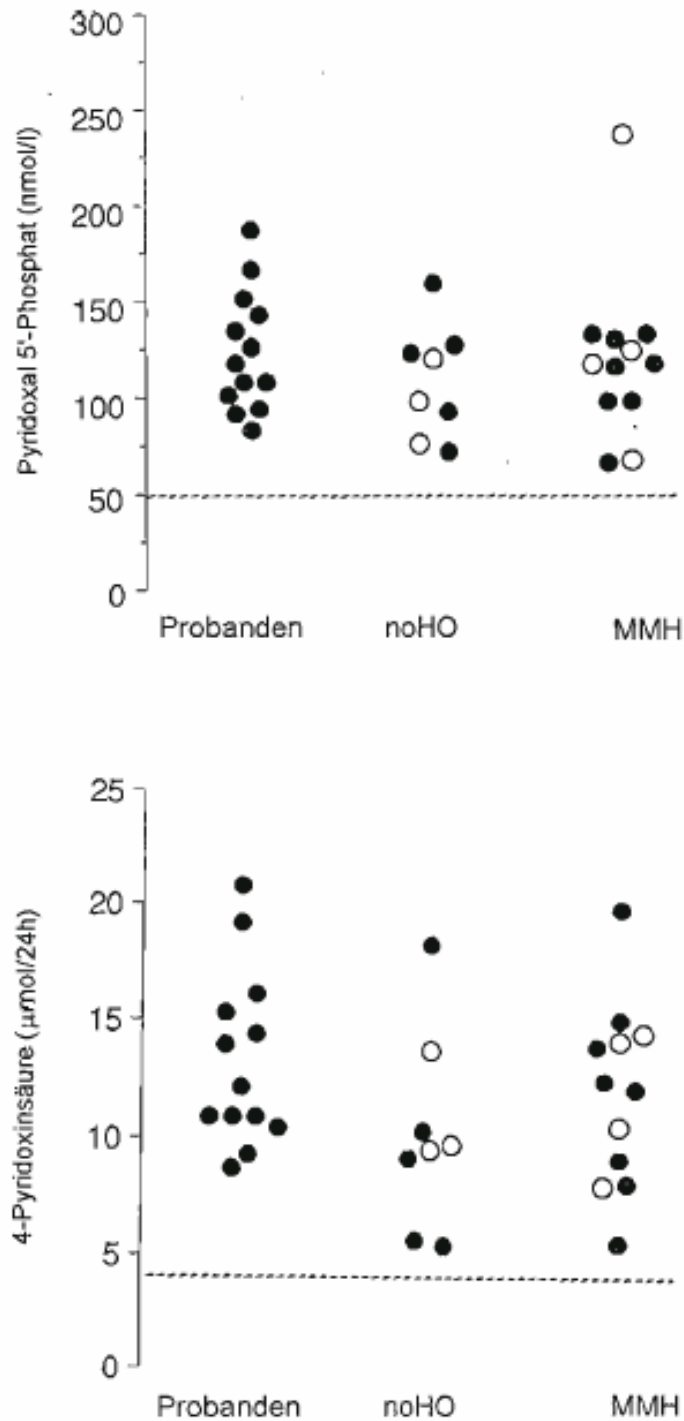


Abbildung 24: Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat und Ausscheidung der 4-Pyridoxinsäure unter der proteinreichen Kost. Die nicht ausgefüllten Kreise (o) entsprechen den Patienten mit einem signifikanten Ansteigen der Oxalatausscheidung. Die beiden horizontalen Linien entsprechen dem 2.5% Quantil des Referenzbereichs.

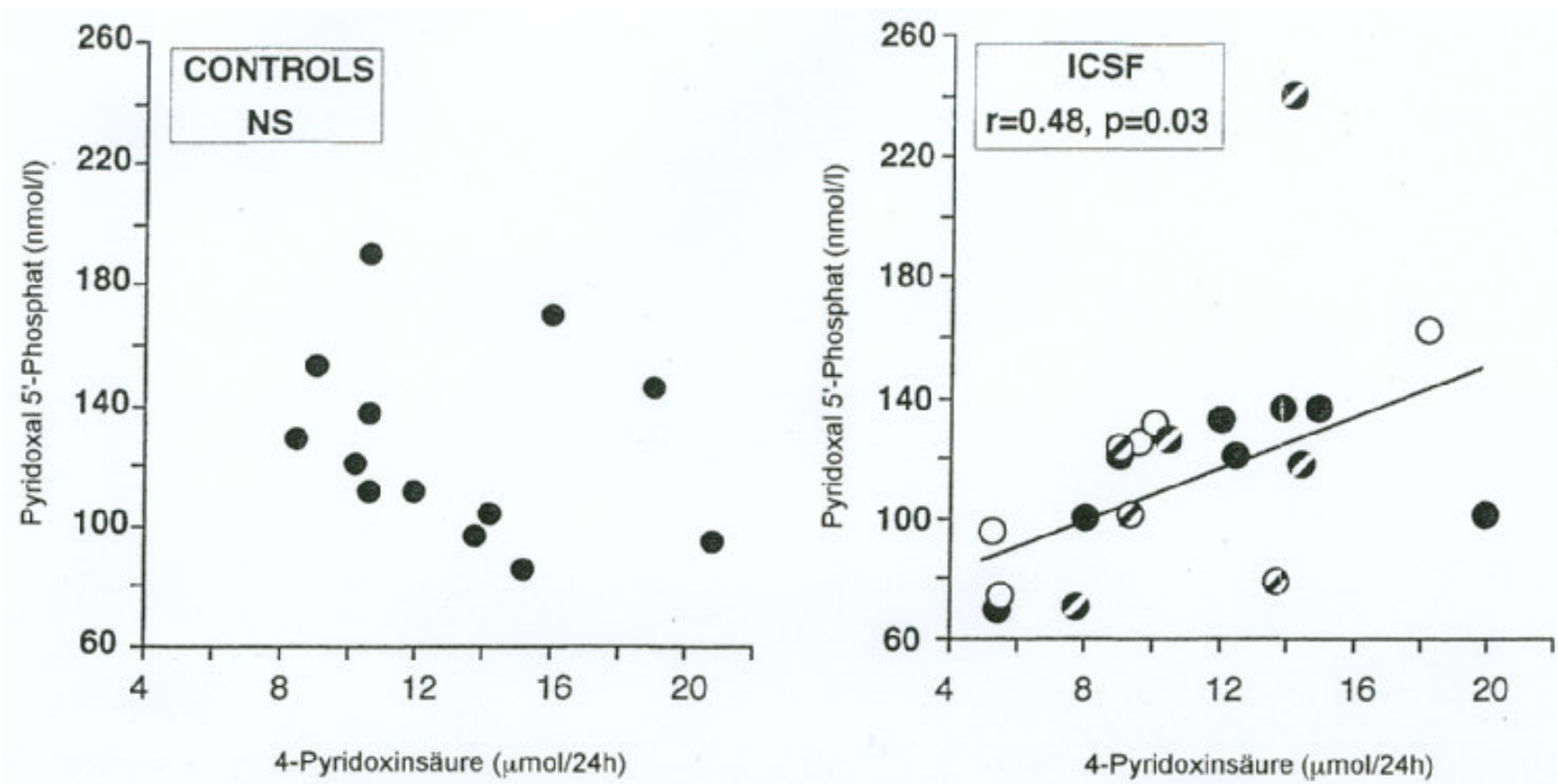


Abbildung 25: Korrelationen zwischen der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat und der Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure bei den gesunden Probanden (Controls) und bei den Nierensteinpatienten (ICSF). Die nicht ausgefüllten Kreise (O) entsprechen den Patienten ohne Hyperoxalurie. Kreise mit einem Balken (Ø) entsprechen Patienten mit einem signifikanten Ansteigen der Oxalatausscheidung.

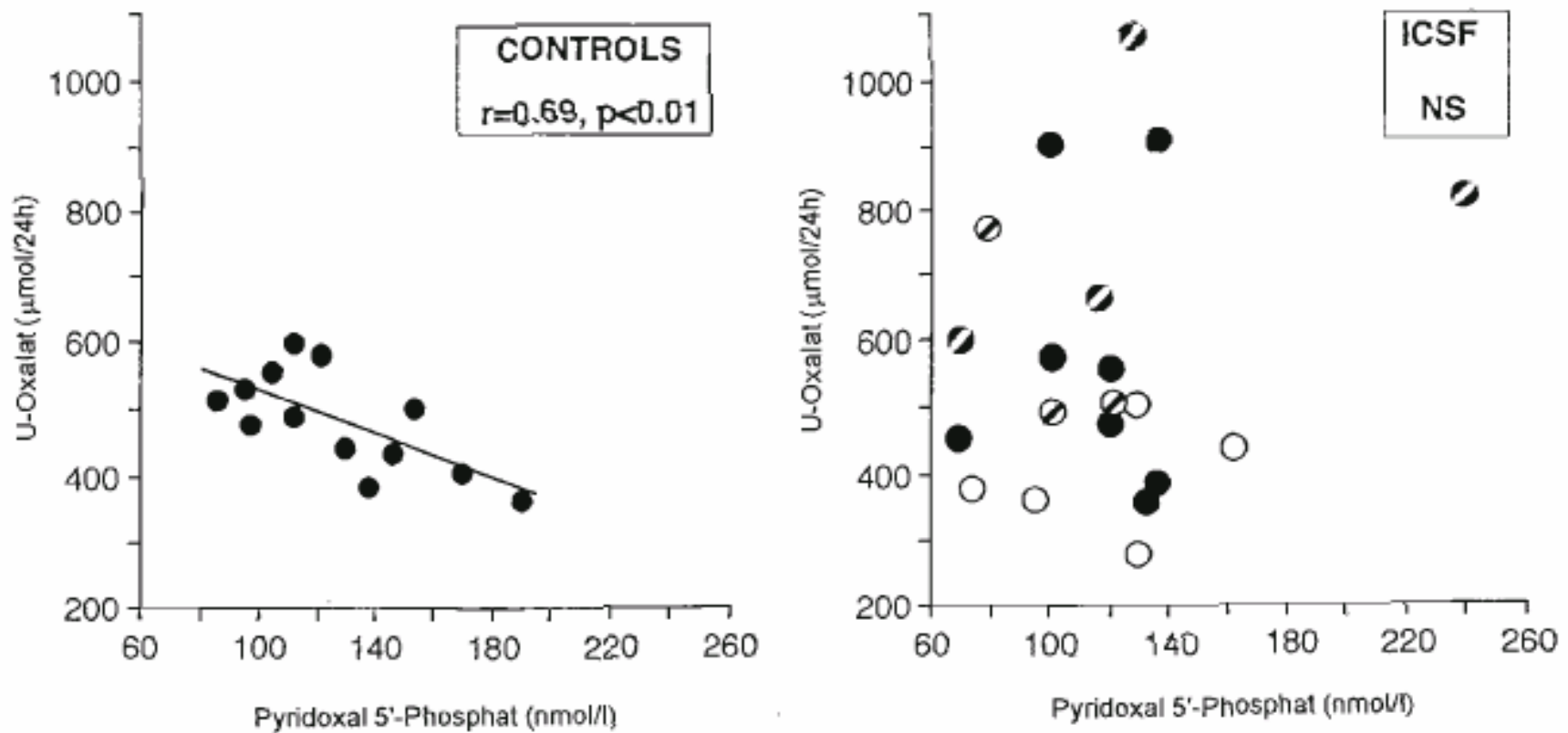


Abbildung 26: Korrelationen zwischen der Oxalatausscheidung und der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat bei den gesunden Probanden und bei den Nierensteinpatienten unter der proteinreichen Kost. Die nicht ausgefüllten Kreise (O) entsprechen den Patienten ohne Hyperoxalurie. Kreise mit einem Balken (Ø) entsprechen Patienten mit einem signifikanten Ansteigen der Oxalatausscheidung.

## 5 DISKUSSION

Bereits früh wurde postuliert, dass eine exzessive Proteinzufuhr bei der Bildung von Nierensteinen eine Schlüsselrolle spiele [Coe 1976, Robertson 1978a, Trinchieri 1991, Curhan 1993], weil sie zu einem Ansteigen der Ausscheidung an lithogenen Substanzen, wie z.B. Kalzium [Robertson 1979, Fellstrom 1984, Wasserstein 1987] und Harnsäure [Robertson 1979, Breslau 1988], führt und die Ausscheidung von Ziträt erniedrigt [Fellstrom 1984]. Die genaue Rolle einer hohen Proteinzufuhr auf die Oxalatausscheidung blieb jedoch kontrovers, da die durchgeführten Studien sowohl bei gesunden Freiwilligen als auch bei Nierensteinpatienten zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangten. Einzelne Studien zeigten nach einer Proteinbelastung eine erhöhte Ausscheidung an Oxalat [Robertson 1979, Urivetzky 1990, Holmes 1993]. Andere Studien konnten diese Resultate nicht bestätigen [Fellstrom 1984, Urivetzky 1987, Kok 1990, Holmes 1993].

Die vorliegende Studie wurde entworfen, um zu testen, ob idiopathische Kalziumsteinpatienten oder nur eine Subpopulation, d.h. Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie, bei einer erhöhten Zufuhr an Fleischprotein mit einem Ansteigen der Oxalatausscheidung reagieren. Tatsächlich zeigen die vorliegenden Daten, dass eine proteinreiche Kost in einem Drittel der Fälle ein Ansteigen der Oxalatausscheidung im Urin von Kalziumsteinpatienten induzierte, nicht jedoch bei gesunden Kontrollen. Man muss sich nun fragen ob die Einteilung in "Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie" überhaupt berechtigt ist. Wir beobachteten, dass (1.) unter der idealen Kost nicht alle gesunden Kontrollen ein normales Urinoxalat hatten und das trotz einer niedrigen Oxalatzufuhr, (2.) 4 von 12 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie eine normale Oxalurie aufwiesen und (3.) 2 von 8 Patienten ohne Hyperoxalurie eine erhöhte Oxalurie hatten. Folglich variierte die Oxalurie weit, und die Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen kann gut nur einem vorübergehenden Zustand entsprechen.

Weil alle Teilnehmer nur eine begrenzte Menge an Oxalat einnahmen, hat die bei den Kalziumsteinpatienten beobachtete erhöhte Oxalatausscheidung nach der Proteinbelastung einen metabolischen Ursprung. Eine Interferenz mit Vitamin C ist aufgrund der Aufzeichnungen unwahrscheinlich. Das beobachtete Absinken der Kohlenhydratzufuhr nach dem Wechsel von der idealen auf die proteinreiche Kost, sollte, wenn überhaupt, die Oxalurie erniedrigen, nicht aber erhöhen [Nguyen 1989, 1995, 1998]. Es ist auch unwahrscheinlich, dass das Ansteigen der Fetteinnahme, entstanden beim Wechsel auf die proteinreiche Kost, zur Änderung der Oxalurie beitrug. Tatsächlich kann Fett durch die Bindung von Kalzium die intestinale Absorption von Oxalat erhöhen [Masai 1995]. Allerdings hätte man dann erwartet, dass dies auch bei den gesunden Kontrollen geschehen würde und nicht nur bei den Kalziumsteinpatienten.

Andere Argumente für ein proteinabhängiges Ansteigen der Oxalurie sind die Korrelationen zwischen der Änderung der Oxalurie und der Änderung der Urinmarker der Proteinzufuhr. Die Tatsache, dass diese Korrelationen nur bei den Kalziumsteinpatienten vorhanden waren, stützt die Behauptung eines pro-

oxalurischen Effekts der Proteine bei diesen Patienten.

Bei den 7 Patienten mit der positiven oxalurischen Antwort auf die Fleischproteinbelastung konnte nichts Spezifisches gefunden werden. Die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat und die Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure waren bei diesen Patienten beide normal. Betrachtet man die Daten genauer, so war bei 25% der idiopathischen Kalziumsteinpatienten die Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure tiefer als der tiefste Wert einer Kontrollperson. Zusätzlich wurde bei den Patienten eine positive Korrelation zwischen Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure gefunden. Die Tatsache, dass bei den gesunden Kontrollen eine negative Korrelation zwischen dem U-Oxalat und dem Pyridoxal 5'-Phosphat vorhanden war, unterstützt zusätzlich die Beziehung zwischen dem Vitamin-B6-Status eines Individuums und seiner Oxalatausscheidung. Dass diese Beziehung bei den idiopathischen Kalziumsteinpatienten fehlte, illustriert zusätzlich die Tatsache, dass bei einem Teil der Patienten verglichen mit der gesunden Population der Vitamin-B6-Metabolismus gestört ist, wie bereits beschrieben. Dies alles der Reihe nach mag zumindest teilweise zur beobachteten Proteinsensitivität und/oder Hyperoxalurie bei einem erheblichen Teil der Patienten mit einer sogenannten idiopathischen Kalziumoxalatsteinbildung beitragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ca. ein Drittel der Patienten mit einem idiopathischen Kalziumsteinleiden, was die Oxalatausscheidung betrifft, gegenüber Fleischprotein sensitiv sind. Nicht alle Patienten sind jedoch gleich empfindlich und um sicher zu sein, dass eine diätetische Massnahme zu einer Änderung der Oxalatausscheidung führt, braucht es wahrscheinlich mehrere 24h-Urine oder viel mehr Versuchspersonen oder beides. Vom praktischen Standpunkt her kann eine Proteinbelastung vorgeschlagen werden, um diejenigen Patienten zu identifizieren, die zumindest theoretisch am meisten von einer Einschränkung der Fleischproteinzufuhr profitieren würden, um dadurch das Risiko eines Rezidivs zu reduzieren. Die Hypothese des aktiven Vitamin-B6-Mangels als Ursache dafür hat sich nicht bestätigt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG, SCHLUSSFOLGERUNGEN UND PERSPEKTIVEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, ob die idiopathische Hyperoxalurie verursacht wird durch (1.) einen inadäquaten Gehalt an Vitamin B6 in der Nahrung, (2.) eine ungenügende Absorption im Darm und/oder (3.) eine gestörte Aktivierung von Vitamin B6. Zusätzlich wollten wir beobachten, ob bei gewissen Patienten dieser allfällige Aktivationsmangel, bezüglich der Oxalatausscheidung, mit einer Überempfindlichkeit gegenüber Fleischprotein verbunden sein könnte. Die Hypothese wurde anhand von drei Teilprojekten überprüft.

In einem ersten Teil wurde zur routinemässigen Erfassung der beiden B6-Vitamere, Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure, eine geeignete Messmethode im Labor entwickelt und geprüft. Unter Berücksichtigung von Sensitivität und Stabilität konnte eine einfache, qualitative und quantitative HPLC-Bestimmungsmethode für das im Serum enthaltene Pyridoxal 5'-Phosphat und die im Urin ausgeschiedene 4-Pyridoxinsäure entwickelt werden. Es handelte sich um eine isokratische Methode mit einem Elutionsmittel sowie der Verwendung von Fluoreszenzdetektion nach Post-Säulen-Derivatisierung mittels Natriumbisulfit. Die Selektivität und die Recovery der Methode waren hoch.

Im zweiten Teil wurde mit gesunden Probanden und Nierensteinpatienten eine offene, nicht randomisierte, klinische Studie durchgeführt.

Von 157 gesunden Probanden, 78 idiopathischen Kalziumsteinpatienten ohne Hyperoxalurie und 79 mit Hyperoxalurie wurden 24h-Urine und Nüchternblutproben untersucht. 50 gesunde Probanden, 15 Patienten ohne Hyperoxalurie und 40 Patienten mit Hyperoxalurie nahmen anschliessend freiwillig an einem 7-tägigen Vitamin-B6-Belastungstest teil. Vor der B6-Belastung wurden für die Urinausscheidung an 4-Pyridoxinsäure zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede gefunden. Bei den Nierensteinpatienten war die Serumkonzentration von Pyridoxal 5'-Phosphat niedriger als bei den Probanden. In 38.3% der Patienten mit Hyperoxalurie und bei 25.4% der Patienten ohne Hyperoxalurie war das Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer als der 5-95%-Referenzbereich der gesunden Probanden. Auch nach der Vitamin-B6-Belastung wurden zwischen den drei Gruppen für die 4-Pyridoxinsäure keine Unterschiede festgestellt. Die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat stieg bei allen Teilnehmern an, blieb jedoch bei 13.3% der Patienten ohne Hyperoxalurie und 32.5% der Patienten mit Hyperoxalurie tiefer als der Referenzbereich der gesunden Teilnehmer.

Mit Hilfe dieser kontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass (1.) die idiopathischen Kalziumsteinpatienten mit oder ohne Hyperoxalurie eine mit gesunden Probanden vergleichbare Zufuhr und Absorption an Vitamin B6 hatten, da

sowohl vor als auch nach der Belastung keine Unterschiede in der Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure festgestellt wurden. (2) Bei mehr als einem Drittel der Kalziumsteinpatienten mit Hyperoxalurie und bei einem Viertel der Kalziumsteinpatienten ohne Hyperoxalurie war eine gestörte Aktivierung von Vitamin B6 vorhanden, da bei gleicher Zufuhr und Absorption die Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat tiefer war. Aufgrund der Messungen der 4-Pyridoxinsäure im Urin sowohl vor als auch nach der Belastung konnte eine fehlende Compliance der Teilnehmer ausgeschlossen werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden 12 Nierensteinpatienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie, 8 Nierensteinpatienten ohne Hyperoxalurie und 13 gesunde Männer unter zwei Diäten studiert, zuerst unter einer 5-tägigen idealen Kost, gefolgt von einer 5-tägigen Kost mit viel Fleischprotein.

Unter der Proteinbelastung stieg die Oxalurie bei 4 Patienten mit einer geringen metabolischen Hyperoxalurie und 3 Patienten ohne Hyperoxalurie aber bei keinem der gesunden Kontrollen. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass schätzungsweise ein Drittel der idiopathischen Kalziumsteinpatienten empfindlich ist gegenüber Fleischprotein und mit einer Erhöhung der Oxalatausscheidung reagiert. Einschränkend muss hier nochmals erwähnt werden, dass die Oxalatausscheidung im Urin von Tag zu Tag sehr variabel ist. Deshalb sollten viel mehr 24h-Urin-Messungen gemacht werden und die Anzahl Teilnehmer pro Gruppe viel grösser sein.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse drängen sich weitere Überlegungen und Fragen auf, denen neue Hypothesen zwangsläufig folgen.

- So wäre es interessant zu wissen, was, trotz der vergleichbaren Zufuhr und Absorption an Vitamin B6, mit dem Pyridoxin im Organismus derjenigen Kalziumsteinpatienten geschieht, die eine gestörte Aktivierung aufweisen. Mit der entwickelten HPLC-Methode könnten ohne grösseren Aufwand nebst Pyridoxal 5'-Phosphat und 4-Pyridoxinsäure auch noch weitere Metaboliten von Pyridoxin bestimmt werden, wie z.B. Pyridoxin- oder Pyridoxamin-Phosphat. So ist denkbar, dass diese Patienten quantitativ und/oder qualitativ eine andere metabolische Transformation aufweisen als gesunde Probanden.
- Die Bestimmung des Oxalats im Blut der Probanden und Patienten wäre hilfreich und würde aufzeigen, ob zwischen dem Oxalat im Blut und der Oxalatausscheidung im Urin tatsächlich eine Korrelation besteht oder eher nicht.
- Interessant ist auch die Tatsache, dass zur Bildung von Pyridoxalphosphat aus Pyridoxin Vitamin B2 notwendig ist, genauer gesagt ein Enzym, welches durch Riboflavin aktiviert wird [Kieffer 1988]. Verschiedene Autoren vermuten, dass eine höhere Riboflavinzufuhr den Vitamin-B6-Status verbessern könnte [Löwik 1994]. So konnte auch gezeigt werden, dass Personen mit einem Vitamin-B2-Mangel verglichen mit gesunden Kontrollen eine kleinere



Ausscheidung an 4-Pyridoxinsäure aufweisen [Kodentsova 1993].

- Eine wichtige Rolle im B6-Metabolismus spielt auch die Alkalische Phosphatase. Bevor Pyridoxal 5'-Phosphat aus der Leber in andere Gewebe aufgenommen wird, wird Pyridoxal 5'-Phosphat durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert [Merrill 1990]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Nierensteinpatienten eine negative Korrelation zwischen der Alkalischen Phosphatase und der Serumkonzentration an Pyridoxal 5'-Phosphat gefunden, ein Zusammenhang, auf den auch in der Literatur hingewiesen wird [Kant 1988, Wan 1993, Iqbal 1998, Bates 1999]. Inwieweit die Alkalische Phosphatase einen Einfluss auf die gestörte Aktivierung des Pyridoxal 5'-Phosphat in gewissen Nierensteinpatienten hat bleibt offen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahrens H, Korytnyk W: Pyridoxine chemistry. XXI. Thin-layer chromatography and thin-layer electrophoresis of compounds in the vitamin B6 group. *Anal Biochem* (1969), 30: 413-420.
- Ahsan SK, Tariq M, Ageel AM, al-Yahya MA, Shah AH: Effect of trigonella foenum-graecum and ammi majus on calcium oxalate urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol* (1989), 26: 249-254.
- Alinei P, Guignard JP, Jaeger Ph: Pyridoxine treatment of type 1 hyperoxaluria. *N Engl J Med* (1984), 311: 798-799.
- Amato M, Donzelli S, Lombardi M, Salvadori M, Carini M, Selli C, Caudarella R: Primary hyperoxaluria: effect of treatment with vitamin B6 and shock waves. *Contr Nephrol* (1987), 58: 190-192.
- Andersen DA: Historical and geographical differences in the pattern of incidence of urinary renal stones considered in relation to possible aetiological factors. In: Hodgkinson A, Nordin BEC (Hrsg.): *Proceedings of the renal stone research symposium*. Churchill Livingstone; London; (1968) 7.
- Anderson BB, Mollin DL: Heat stability of serum pyridoxal. *Am J Clin Nutr* (1974), 27: 1357.
- Ang CYW: Stability of three forms of vitamin B6 to laboratory light conditions. *J Assoc Off Anal Chem* (1979), 62: 1170-1173.
- Bai SC, Sampson DA, Morris JG, Rogers QR. The level of dietary protein affects the vitamin B-6 requirement of cats. *J Nutr* (1991), 121: 1054-1061.
- Balcke P, Schmidt P, Zazgornik J, Kopsa H, Minar E: Pyridoxine therapy in patients with renal calcium oxalate calculi. *Proc EDTA* (1983), 20: 417-421.
- Balogh F, Götz F, Köves S: The importance of Magurlit in the prevention and dissolution of uric acid stones. *Ther Hung* (1980), 28: 28-31.
- Baranyai E, Kis E, Szebeni R: Five-year observations with Magurlit, a stone-dissolving granulate. *Ther Hung* (1980), 28: 177-179.
- Baranyay E, Kish E, Sebeni R: Use of Margulit for resolving renal calculi. *Urol Nefrol* (1979), 5: 12-14.
- Bates CJ, Pentieva KD, Prentice A: An appraisal of vitamin B6 status indices and associated confounders, in young people aged 4-18 years and in people aged 65 years and over, in two national British surveys. *Public Health Nutr* (1999), 2: 529-535.
- Bitsch R: Vitamin B6. *Int J Vitam Nutr Res* (1993), 63: 278-282.
- Boyce WH, Garvey FK: Incidence of urinary calculi among patients in general hospitals, 1948 to 1952. *J Am Med Assoc* (1956), 161: 1437-1442.
- Boyce WH: Epidemiology of lithiasis in the United States. In: *Proceedings of the 17<sup>th</sup> congress of the International Society of Urology*. Paris, Joly; (1979) 79-86.
- Breslau NA, Brinkley L, Hill KD, Pak CY: Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* (1988), 66: 140-146.

- Bridges JW, Davies DS, Williams RT: Fluorescence studies on some hydroxypyridines including compounds of the vitamin B6 group. *Biochem J* (1966), 98: 451-468.
- Buchholz AE, Verplough CI, Smith JL: A method for the simultaneous measurement of less than a part-per-million of chloride, nitrate, and sulfate in aqueous samples by nonsuppressed ion chromatography. *J Chromatogr Sci* (1982), 20: 499-501.
- Buttery JE, Ludvigsen N, Braiotta EA, Pannall PR: Determination of urinary oxalate with commercially available oxalate oxidase. *Clin Chem* (1983), 29: 700-702.
- Chabner B, Livingston D: A simple enzymic assay for pyridoxal phosphate. *Anal Biochem* (1970), 34: 413-423.
- Chalmers AH, Cowley DM, Brown JM: A possible etiological role for ascorbate in calculi formation. *Clin Chem* (1986), 32: 333-336.
- Chauhan MS, Dakshinamurti K: Fluorometric assay of B6 vitamers in biological material. *Clin Chim Acta* (1981), 109: 159-167.
- Chiriboga J: Some properties of an oxalic acid oxidase purified from barley seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* (1963), 11: 277-282.
- Coburn SP, Mahuren JD: A versatile cation-exchange procedure for measuring the seven major forms of vitamin B6 in biological samples. *Anal Biochem* (1983), 129: 310-317.
- Coe FL, Moran E, Kavalich AG: The contribution of dietary purine overconsumption to hyperuricosuria in calcium oxalate stone formers. *J Chronic Dis* (1976), 29: 793-800.
- Coe FL, Parks JH, Asplin JR: The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* (1992), 327: 1141-1152.
- Colombo JP: Klinisch-chemische Urindiagnostik. *LABOLIFE*; Rotkreuz; (1994) 29.
- Contractor SF, Shane B: Estimation of vitamin B6 compounds in human blood and urine. *Clin Chim Acta* (1968), 21: 71-77.
- Costello JF, Sadovnic MC, Smith M, Stolarski C: Effect of vitamin B6 supplementation on plasma oxalate and oxalate removal rate in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* (1992), 3: 1018-1024.
- Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP: The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum Mol Genet* (1999), 8: 2063-2069.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ: A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med* (1993), 328: 833-838.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ: A prospective study of the intake of vitamins C and B6, and the risk of kidney stones in men. *J Urol* (1996), 155: 1847-1851.
- Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ: Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol* (1999), 10: 840-845.
- Daunderer M: Toxikologische Enzyklopädie, Klinische Toxikologie. 83. Erg.-Lfg. 5/94. Ecomed; Landsberg/Lech; (1981) Pyridoxin II-2.4.3.

- Davis RE, Smith BK: Heat stability of synthetic and natural pyridoxal. *Am J Clin Nutr* (1974a), 27: 1358.
- Davis RE, Smith BK: The heat stability of synthetic and natural pyridoxal. *Am J Clin Nutr* (1974b), 27: 323.
- Dementjeva EN, Drobinskaya NA, Ionova LV, Karpeisky MY, Florentiev VL: Super thin-layer chromatography of vitamin B6 and its derivatives. *Biokhimiia* (1968), 33: 350-354.
- Driskell JA, Mc. Chrisley B: Plasma B-6 vitamer and plasma and urinary 4-pyridoxic acid concentrations in young women as determined using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* (1991), 5: 198-201.
- Durkó I, Vladovska-Yukhnovska Y, Ivanov CP: A new fluorometric method for the determination of vitamin B6 in blood. *Clin Chim Acta* (1973), 49: 407-414.
- EDI, Eidgenössisches Departement des Innern: Pharmacopoea Helvetica. Editio septima. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale; Bern; (1995) Monographie Pyridoxini hydrochloridum.
- Editorial: Dietary protein and vitamin B6 requirements. *Nutr Rev* (1987), 45: 23-25.
- Editorial: Magnesium oxide-pyridoxine therapy for recurrent urolithiasis. *Nutr Rev* (1976), 34: 18-20.
- Edwards P, Liu PKS, Rose GA: A simple liquid-chromatographic method for measuring vitamin B6 compounds in plasma. *Clin Chem* (1989), 35: 241-245.
- Edwards P, Nemat S, Rose GA: Effects of oral pyridoxine upon plasma and 24-hour urinary oxalate levels in normal subjects and stone formers with idiopathic hypercalciuria. *Urol Res* (1990), 18: 393-396.
- Edwards P, Rose GA: Metabolism of pyridoxine in mild metabolic hyperoxaluria and primary hyperoxaluria (type 1). *Urol Int* (1991), 47: 113-117.
- Erwin DT: Nephrolithiasis: recent advances in therapy. *South Med J* (1976), 69: 935-937.
- Fellstrom B, Danielson BG, Karlstrom B, Lithell H, Ljunghall S, Vessby B, Wide L: Effects of high intake of dietary animal protein on mineral metabolism and urinary supersaturation of calcium oxalate in renal stone formers. *Br J Urol* (1984), 56: 263-269.
- Ferrol CE, Trumbo PR: Bioavailability of vitamin B6 in young and older men. *Am J Clin Nutr* (1994), 60: 68-71.
- Frosch M, Kuwertz-Bröking E, Bulla M, von Bassewitz DB, Leusmann DB: Oxalose Typ I im Kindesalter – Beobachtungen im Rahmen der terminalen Niereninsuffizienz beim Kind. *Klin Wochenschr* (1989), 67: 1156-1167.
- Gaudiano A, Polizzi-Sciarrone M: Metodi spettrofotometrici per la determinazione delle vitamine B6. *Ann Ist Super Sanità* (1965), 1: 588-602.
- Gershoff SN, Prien EL: Effect of daily MgO and vitamin B6 administration to patients with recurring calcium oxalate kidney stones. *Am J Clin Nutr* (1967), 20: 393-399.
- Gershoff SN: Production of urinary calculi in vitamin B6-deficient male, female and castrated male rats. *J Nutr* (1970), 100: 117-122.

- Gerster H: No contribution of ascorbic acid to renal calcium oxalate stones. *Ann Nutr Metab* (1997), 41: 269-282.
- Giannini S, Nobile M, Sartori L, Dalle Carbonare L, Ciuffreda M, Corro P, D'Angelo A, Calo L, Crepaldi G: Acute effects of moderate dietary protein restriction on patients with idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Am J Clin Nutr* (1999), 69: 267-271.
- Gibbs DA, Watts RWE: The action of pyridoxine in primary hyperoxaluria. *Clin Sci* (1970), 38: 277-286.
- Gill HS, Rose GA: Mild metabolic hyperoxaluria and its response to pyridoxine. *Urol Int* (1986), 41: 393-396.
- Goldenberg RM, Girone JAC. Oral pyridoxine in the prevention of oxalate kidney stones. *Am J Nephrol* (1996), 16: 552-553.
- Goldfarb DS, Coe FL: Prevention of recurrent nephrolithiasis. *Am Fam Physician* (1999), 60: 2269-2276.
- Grases F, Melero G, Costa-Bauza A, Prieto R, March JG: Urolithiasis and phytotherapy. *Int Urol Nephrol* (1994), 26: 507-511.
- Gregory III JF, Kirk JR: Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* (1979), 32: 879-883.
- Grimm U, Steinhauser I, Wulff K, Knapp A, Zschesche M: Tryptophanstoffwechselstudien bei Calciumoxalat-Urolithiasis. *Z Urol Nephrol* (1988), 81: 299-303
- Gulati S, Narula R, Sadhna S, Sidhu H, Wangoo D, Thind SK, Nath R: Effect of magnesium and pyridoxine supplementation on glycolate induced hyperoxaluria in male albino rats. *Indian J Exp Biol* (1988), 26: 525-527.
- Hall PM: Calcium stones: calcium restriction not warranted. *Cleve Clin J Med* (1995), 62: 71-72.
- Hamfelt A: Enzymatic determination of pyridoxal phosphate in plasma by decarboxylation of L-Tyrosine-<sup>14</sup>C(U) and a comparison with the tryptophan load test. *Scand J Clin Lab Invest* (1967), 20: 1-10.
- Hansen CM, Leklem JE, Miller LT: Changes in vitamin B-6 status indicators of women fed a constant protein diet with varying levels of vitamin B-6. *Am J Clin Nutr* (1997), 66: 1379-1387.
- Hartke K, Mutschler E: DAB-9 Kommentar. 9. Ausgabe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart; (1986a) 284-297.
- Hartke K, Mutschler E: DAB-9 Kommentar. 9. Ausgabe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart; (1986b) 254-257.
- Hartke K, Mutschler E: DAB-9 Kommentar. 9. Ausgabe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart; (1986c) 2900-2906.
- Hautmann R, Kleinschmidt K: Therapie urologischer Erkrankungen. Ferdinand Enke; Stuttgart; (1992) 39-47.
- Hess B, Ackermann D, Essig M, Takkinen R, Jaeger Ph: Renal mass and serum calcitriol in male idiopathic calcium renal stone formers: Role of protein intake. *J Clin Endocrinol Metab* (1995a), 80: 1916-1921.
- Hess B, Ackermann D: Prophylaxe bei Infekt-, Harnsäure- und Zystinsteinen. *Ther Umsch* (1992), 49: 44-48.
- Hess B: Diagnostische Marker bei Kalzium-Nephrolithiasis - Neues und Althergebrachtes in neuem Gewand. *Schweiz Med Wochenschr* (1995b), 125:

- 2460-2470.
- Hess B: Nierensteine - wie häufig treten sie auf? *Magazin Medizin Zeitung* (1999), 1: 1-4.
- Hesse A, Vahlensieck W: Krappanthrachinonpräparate zur Therapie und Rezidivprophylaxe des Harnsteinleidens. *Therapiewoche* (1984), 34: 5586.
- Hiatt RA, Friedman GD: The frequency of kidney and urinary tract diseases in a defined population. *Kidney Int* (1982), 22: 63-68.
- Hirose N, Kubo N, Tsuge H: Highly sensitive determination of PLP in human plasma with HPLC method. *J Nutr Sci Vitaminol* (1990), 36: 521-529.
- Hoff-Jørgensen E: Antivitamins for B6. *Bibl Nutr Dieta* (1966), 8: 160-168.
- Holick MF: Defects in the synthesis and metabolism of vitamin D. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1995), 103: 219-227.
- Holmes RP, Goodman HO, Hart LJ, Assimios DG: Relationship of protein intake on urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int* (1993), 44: 366-372.
- Hudson CA, Betschart AA, Turnlund JR, Kretsch MJ, Sauberlich HE. Protein utilization by young women consuming animal or plant protein diets at various levels of vitamin B-6 intake. *Am J Clin Nutr* (1989), 49: 636-640.
- Ink SL, Henderson LM: Vitamin B6 Metabolism. *Ann Rev Nutr* (1984), 4: 455-470.
- International Union for Pure and Applied Chemistry, Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): Nomenclature for vitamins B6 and related compounds. Recommendations 1973. *Eur J Biochem* (1973a), 40: 325-327.
- International Union for Pure and Applied Chemistry, Commission on Biochemical Nomenclature: Definitive nomenclature for vitamins B6 and related compounds. *Pure Appl Chem* (1973b), 33: 447-452.
- Iqbal SJ, Brain A, Reynolds TM, Penny M, Holland S: Relationship between serum alkaline phosphatase and pyridoxal 5'-phosphate levels in hypophosphatasia. *Clin Sci* (1998), 94: 203-206.
- Izashvili NP, Kasabyan EV: Metabolism of vitamin B6, citric, oxalic acids, calcium and magnesium in patients with nephrolithiasis. *Urol Nefrol* (1973), 38: 9-13.
- Jaeger Ph, Portmann L, Jacquet AF, Burckhardt P: La pyridoxine peut normaliser l'oxalurie dans la lithiase rénale idiopathique. *Schweiz med Wschr* (1986), 116: 1783-1786.
- Jaeger Ph: Renal stone disease in the 1990s: the powder keg and tinderbox theory. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (1992), 1: 141-148.
- Jaworski RJ, O'Leary MH: <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of the vitamin B6 group. *Methods Enzymol* (1979), 62: 436-454.
- Jocham D, Miller K: *Praxis der Urologie. Band I.* Georg Thieme; Stuttgart, New York; (1994) 518-541.
- Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS, Kurland LT: Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int* (1979), 16: 624-631.
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ: Identification and characterization of HAOX1, HAOX2, and HAOX3, three human peroxisomal 2-hydroxy acid oxidases. *J Biol Chem* (2000), 275: 12590-12597.

- Kaelin A, Casez JP, Jaeger Ph: Vitamin B6 metabolites in idiopathic calcium stone formers: no evidence for a link to hyperoxaluria. *Urol Res* (2004), 32: 61-68.
- Kanig SP, Conn RL: Kidney stones. Medical management and newer options for stone 'removal'. *Postgrad Med* (1985), 78: 38-51.
- Kant AK, Moser-Veillon PB, Reynolds RD: Effect of age on changes in plasma, erythrocyte, and urinary B-6 vitamers after an oral vitamin B-6 load. *Am J Clin Nutr* (1988), 48: 1284-1290.
- Kasidas GP, Rose GA: A new enzymatic method for the determination of glycollate in urine and plasma. *Clin Chim Acta* (1979), 96: 25-36.
- Kemper MJ, Conrad S, Muller-Wiefel DE: Primary hyperoxaluria type 2. *Eur J Pediatr* (1997), 156: 509-512.
- Khan SR: Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. *Am J Kidney Dis* (1991), 17: 398-401.
- Kieffer F: Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente steuern die Körperfunktionen. Wissenschaftlicher Informationsdienst der Wander AG; Bern; (1988) 29-31.
- Kimura M, Kanehira K, Yokoi K: Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in plasma of B6 vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate. *J Chromatogr A* (1996), 722: 295-301.
- Klosterman HJ: Vitamin B6 antagonists of natural origin. *Methods Enzymol* (1979), 62: 483-495.
- Kodentsova VM, Yakushina LM, Vrzhesinskaya LA, Beketova NA, Spirichev VB: Riboflavin concentration and metabolism of vitamin B6. *Vopr Pitan* (1993), 5: 32-36.
- Kok DJ, Iestra JA, Doorenbos CJ, Papapoulos SE: The effects of dietary excess in animal protein and in sodium on the composition and the crystallization kinetics of calcium oxalate monohydrate in urines of healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* (1990), 71: 861-867.
- Körner WF, Nowak H: Quantitative Bestimmung der biologischen Aktivität von Vitamin-B6-Wirkung von Pyridoxol-Antagonisten. *Int Z Vitaminforsch* (1967), 37: 89-94.
- Korytnyk W, Fricke G, Paul B: Pyridoxine chemistry. XII. Gas chromatography of compounds in the vitamin B6 group. *Anal Biochem* (1966), 17: 66-75.
- Křidl J, Zvara V, Revúsová V, Gratzlová J, Ondruš B: Inhibition der Kalzium-oxalat-Urolithiasis durch Pyridoxin und Magnesium im Experiment. *Bratisl Lek Listy* (1984), 81: 21-28.
- Latta K: Pyridoxine sensitivity in primary hyperoxaluria type I (PH1). *Nephrol Dial Transplant* (1999), 14: 2787.
- Latta K, Brodehl J: Primary hyperoxaluria type I. *Eur J Pediatr* (1990), 149: 518-522.
- Leinert J, Simon I, Hötzel D: Methoden und deren Wertung zur Bestimmung des Vitamin-B6-Versorgungszustandes beim Menschen. *Internat J Vit Nutr Res* (1982), 52: 24-35.
- Ljunghall S: Family history of renal stone-formers and healthy subjects. *Br J Urol* (1979), 51: 249-252.
- Löwik MRH, van den Berg H, Kistemaker C, Brants HAM, Brussaard JH: Inter-

- relationships between riboflavin and vitamin B6 among elderly people (Dutch nutrition surveillance system). *Internat J Vit Nutr Res* (1994), 64: 198-203.
- Löwik MRH, van den Berg H, Westenbrink S, Wedel M, Schrijver J, Ockhuizen T: Dose-response relationships regarding vitamin B6 in elderly people: a nationwide nutritional survey (Dutch nutritional surveillance system). *Am J Clin Nutr* (1989), 50: 391-399.
- Lumeng L, Schenker S, Li T, Brashear RE, Compton MC: Clearance and metabolism of plasma pyridoxal 5'-phosphate in the dog. *J Lab Clin Med* (1984), 103: 59-69.
- Mahuren JD, Coburn SP: B6 vitamers: cation exchange HPLC. *J Nutr Biochem* (1990), 1: 659-663.
- Mantsch HH, Smith ICP: Carbon-13 Nuclear magnetic resonance spectroscopy of the vitamin B6 group. *Methods Enzymol* (1979), 62: 422-435.
- Marangella M, Bianco O, Martini C, Petrarulo M, Vitale C, Linari F: Effect of animal and vegetable protein intake on oxalate excretion in idiopathic calcium stone disease. *Br J Urol* (1989), 63: 348-351.
- Marangella M, Petrarulo M, Vitale C, Cosseddu D, Linarai F: Plasma and urine glycolate assays for differentiating the hyperoxaluria syndromes. *J Urol* (1992), 148: 986-989.
- Maroni BJ, Steinman TI, Mitch WE: A method for estimating nitrogen intake of patients with chronic renal failure. *Kidney Int* (1985), 27: 58-65.
- Masai M, Ito H, Kotake T: Effect of dietary intake on urinary oxalate excretion in calcium renal stone formers. *Br J Urol* (1995), 76: 692-696.
- Merrill AH, Henderson JM: Vitamin B6 metabolism by human liver. *Ann N Y Acad Sci* (1990), 585: 110-117.
- Milliner DS, Eickholt JT, Bergstralh EJ, Wilson DM, Smith LH: Results of long-term treatment with orthophosphate and pyridoxine in patients with primary hyperoxaluria. *N Engl J Med* (1994), 331: 1553-1558.
- Mitwalli A, Ayiomamitis A, Grass L, Oreopoulos DG: Control of hyperoxaluria with large doses of pyridoxine in patients with kidney stones. *Int Urol Nephrol* (1988), 20: 353-359.
- Morant J, Ruppanner H: *Arzneimittelkompendium der Schweiz* 1995. 16. Aufl. Documed AG; Basel; (1994a) 191-192.
- Morant J, Ruppanner H: *Arzneimittelkompendium der Schweiz* 1995. 16. Aufl. Documed AG; Basel; (1994b) 2052-2053.
- Morozov YV, Bazhulina NP, Cherkashina LP, Karpeiskii MY: Optical and luminescent properties of vitamin B6 and its derivatives: V. Pyridoxal and pyridoxal-5'-phosphate. Luminescent properties. *Biofizika* (1967), 12: 773-781.
- Murthy MSR, Farooqui S, Talwar HS, Thind SK, Nath R, Rajendran L, Bapna BC: Effect of pyridoxine supplementation on recurrent stone formers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* (1982), 20: 434-437.
- Murthy MSR, Talwar HS, Thind SK, Nath R: Effect of pyridoxine on sodium glycolate induced hyperoxaluria in rats. *Biochem Med* (1981), 26: 77-84.
- Nath R, Thind SK, Murthy MSR, Farooqui S, Gupta R, Koul HK: Role of pyridoxine in oxalate metabolism. *Ann NY Acad Sci* (1990), 585: 274-284.



- Nguyen NU, Dumoulin G, Henriët MT, Regnard J: Aspartame ingestion increases urinary calcium, but not oxalate excretion, in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* (1998), 83: 165-168.
- Nguyen NU, Dumoulin G, T. HM, Regnard J: Increase in urinary calcium and oxalate after fructose infusion. *Horm Metab Res* (1995), 27: 155-158.
- Nguyen NU, Dumoulin G, Wolf JP, Berthelay S: Urinary calcium and oxalate excretion during oral fructose or glucose load in man. *Horm Metab Res* (1989), 21: 96-99.
- Nirmalchandar V, Balasubramanian N: Spectrophotometric determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical samples. *Analyst* (1988), 113: 1097-1099.
- Nolkemper D, Kemper MJ, Burdelski M, Vaismann I, Rogiers X, Broelsch CE, Ganschow R, Muller-Wiefel DE: Long-term results of pre-emptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type 1. *Pediatr Transplant* (2000), 4: 177-181.
- Okada M, Shibuya M, Akazawa T, Muya H, Murakami Y. Dietary Protein as a factor affecting vitamin B6 requirement. *J Nutr Sci Vitaminol* (1998), 44: 37-45.
- Pak CYC, Smith LH, Resnick MI, Weinerth JK. Dietary management of idiopathic calcium urolithiasis. *J Urol* (1984), 131: 850-852.
- Pak CYC: Urolithiasis. In: Schrier RW, Gottschalk CW (Hrsg.): Diseases of the kidney. 5. Aufl. Little, Brown and Company; Boston, Toronto, London; (1993) 729-741.
- Pannemans DL, Van den Berg H, Westerterp KR: The influence of protein intake on vitamin B-6 metabolism differs in young and elderly humans. *J Nutr* (1994), 124: 1207-1214.
- Parry ES, Lister IS: Sunlight and hypercalciuria. *Lancet* (1975), 1: 1063-1065.
- Prien EL, Gershoff SF: Magnesium oxide-pyridoxine therapy for recurrent calcium oxalate calculi. *J Urol* (1974), 112: 509-512.
- Prien EL: The riddle of urinary stone disease. *JAMA* (1971), 216: 503-507.
- Radermacher L, Godon JP: Le traitement médical préventif des lithiases rénales. *Rev Med Liege* (1992), 47: 510-522.
- Rattan V, Sidhu H, Vaidyanathan S, Thind SK, Nath R: Effect of combined supplementation of magnesium oxide and pyridoxine in calcium-oxalate stone formers. *Urol Res* (1994), 22: 161-165.
- Reitzer-Bergaentzle M, Marchioni E, Hasselmann C: HPLC determination of vitamin B6 in food after pre-column derivatization of free and phosphorylated vitamers into pyridoxol. *Food Chem* (1993), 48: 321-324.
- Revúsová V, Gratzlová J, Zvara V, Krídl J, Suchánek B, Breza J: The evaluation of some biochemical parameters in pyridoxine-treated calcium oxalate renal stone formers. *Urol Int* (1977), 32: 348-352.
- Revúsová V, Gratzlová J, Zvara V, Krídl J, Suchánek B: Effect of long-term administration of pyridoxine on the serum and urine levels of lithogenic substances in calcium-oxalate urolithiasis. *Vnitr Lék* (1978), 24: 445-450.
- Revúsová V, Gratzlová J, Zvara V, Krídl J, Suchánek B: The significance of oxaluria reduction in pyridoxine prevention of Ca-oxalate nephrolithiasis. *Čas Lék čes* (1982), 121: 163-166.

- Ribaya JD, Gershoff SN: Effects of hydroxyproline and vitamin B6 on oxalate synthesis in rats. *J Nutr* (1981), 111: 1231-1239.
- Richardson KE: Effects of vitamin B6, glycolic acid, testosterone, and castration on the synthesis, deposition, and excretion of oxalic acid in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* (1967), 10: 40-53.
- Robertson WG, Heyburn PJ, Peacock Mj, Hanes FA, Swaminathan R: The effect of high animal protein intake on the risk of calcium stone-formation in the urinary tract. *Clin Sci* (1979), 57: 285-288.
- Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Hanes FA: Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scan J Urol* (1980) 15-28.
- Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB: Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Br J Urol* (1978a), 50: 449-454.
- Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Speed R, Hanes F: The role of affluence and diet in the genesis of calcium containing stones. *Fortschr Urol Nephrol* (1978b), 11: 5-14.
- Rose CS, György P, Butler M, Andres R, Norris AH, Shock NW, Tobin J, Brin M, Spiegel H: Age differences in vitamin B6 status of 617 men. *Am J Clin Nutr* (1976), 29: 847-853.
- Roth S, Semjonow A, Rathert P: *Klinische Urologie. Vom Befund zur Therapie.* Springer; Berlin, Heidelberg, New York; (1993) 138-166.
- Rücker G, Neugebauer M, Willems GG: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.* 2. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart; (1992) 270-285.
- SAV: *Apotheken-Handbuch der Schweiz 1999-2000.* Medon Verlag AG; Horw; (1999) 61.
- Schneider HJ, Hesse A, Berg W, Kirsten J, Nickel H: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Magnesium und Vitamin B6 auf die Kalziumoxalatnephrolithiasis. *Zschr Urol* (1977), 70: 419-427.
- Schneider HJ: Ätiologie, Pathogenese, konservative Therapie. In: Jocham D, Miller K: *Praxis der Urologie, Band I.* Georg Thieme; Stuttgart, New York; (1994) 518-541.
- Schneider HJ: *Phytopharmaka in der Harnsteintherapie.* *Med Welt* (1985), 36: 1050.
- Shah GM, Ross EA, Sabo A, Pichon M, Reynolds RD, Bhagavan H: Effects of ascorbic acid and pyridoxine supplementation on oxalate metabolism in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* (1992), 20: 42-49.
- Sharma SK, Dakshinamurti K: Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples. *J Chromatogr* (1992), 578: 45-51.
- Shephard GS, Labadarios D: Degradation of vitamin B6 standard solutions. *Clin Chim Acta* (1986), 160: 307-311.
- Shultz TD, Leklem JE: Urinary 4-pyridoxic acid, urinary vitamin B6 and plasma pyridoxal phosphate as measures of vitamin B6 status and dietary intake in adults. 297-320.
- Sidhu H, Gupta R, Farooqui S, Thind SK, Nath R: Absorption of glyoxylate and oxalate in thiamine and pyridoxine deficient rat intestine. *Biochem Int* (1986), 12: 71-79.

- Simon I, Leinert J, Hötzel D: Methoden und deren Wertung zur Bestimmung des Vitamin-B6-Versorgungszustandes beim Menschen. 4. Mitteilung: 4-PA: Die Aussagefähigkeit des Parameters. *Internat J Vit Nutr Res* (1982), 52: 287-297.
- Smith LH: Hyperoxaluric states. In: Coe FL, Favus MJ (Hrsg.): Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press; (1992) 707-727.
- Smith MA, Dietrich LS: Preparative thin-layer chromatography for the separation of the various forms of vitamin B6 in tissues. Vitamin B6 content of chick embryo liver during the midperiod of development. *Biochim Biophys Acta* (1971), 230: 262-270.
- Stahel W: Statistische Datenanalyse. Eine Einführung für Naturwissenschaftler. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH; Braunschweig/Wiesbaden; (1995)
- Stein G, Ritz E: Diagnostik und Differentialdiagnostik der Nierenerkrankungen. 2. Aufl. Gustav Fischer; Jena, Stuttgart; (1995) 352-371.
- Sutton RAL, Walker VR: Enteric and mild hyperoxaluria. *Miner Electrolyte Metab* (1994), 20: 352-360.
- Takanashi S, Matsunaga I, Tamura Z: Fluorometric determination of pyridoxal and its 5'-phosphate in biological materials. *J Vitaminol* (1970b), 16: 132-136.
- Takanashi S, Tamura Z: Preliminary studies for fluorometric determination of pyridoxal and of its 5'-phosphate. *J Vitaminol* (1970a), 16: 129-131.
- Thanassi JW, Cidlowski JA: A radioimmunoassay for phosphorylated forms of vitamin B6. *J Immunol Methods* (1980), 33: 261-266.
- Thomas WC, Malagodi MH: Dietary habits in patients with calcareous calculi, in idiopathic urinary bladder stone disease, edited by Reen V, Washington, US Department of Health, Education and Welfare, 1977, 311-320.
- Tiselius HG, Almgård LE: The diurnal urinary excretion of oxalate and the effect of pyridoxine and ascorbate on oxalate excretion. *Eur Urol* (1977b), 3: 41-46.
- Tiselius HG: Excretion of 4-pyridoxic acid and oxalic acid in patients with urinary calculi. *Invest Urol* (1977a), 15: 5-8.
- Toftagaard-Nielsen T: A method for enzymatic determination of citrate on serum and urine. *Scand J Clin Lab Invest* (1976), 36: 513-519.
- Tomson CRV, Channon SM, Parkinson IS, Sheldon WS, Ward MK, Laker MK: Effect of pyridoxine supplementation on plasma oxalate concentrations in patients receiving dialysis. *Eur J Clin Invest* (1989), 19: 201-205.
- Tóth C, Hódi I, Szebeni R: Observations with Magurlit in the care of nephrolithiasis patients. *Ther Hung* (1979), 27: 137-140.
- Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, Longo G, Pisani E: The influence of diet on urinary risk factors for stones in healthy subjects and idiopathic renal calcium stone formers. *Br J Urol* (1991), 67: 230-236.
- Ubbink JB, Serfontein WJ, de Villiers LS: Stability of pyridoxal-5-phosphate semicarbazone: applications in plasma vitamin B6 analysis and population surveys of vitamin B6 nutritional status. *J Chromatogr* (1985), 342: 277-284.
- Urivetzky M, Braverman S, Motola JA, Smith AD: Absence of effect of allopuri-

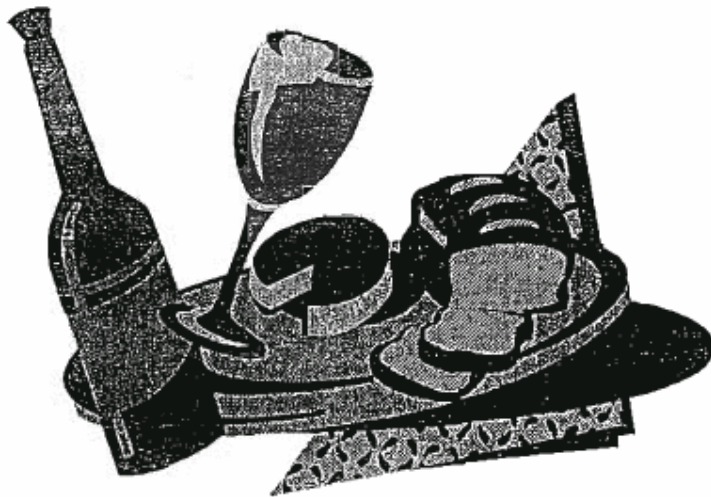
- nol on oxalate excretion by stone patients on random and controlled diets. *J Urol* (1990), 144: 97-98.
- Urivetzky M, Motola J, Braverman S, Smith AD: Dietary protein levels affect the excretion of oxalate and calcium in patients with absorptive hypercalciuria type II. *J Urol* (1987), 137: 690-692.
- Vanderslice JT, Maire CE, Beecher GR: B6 vitamer analysis in human plasma by high performance liquid chromatography: a preliminary report. *Am J Clin Nutr* (1981), 34: 947-950.
- Vuilleumier JP, Keller HE, Rettenmaier R, Hunziker F: Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Part II: The water-soluble vitamins B1, B2 and B6. *Internat J Vit Nutr Res* (1983), 53: 359-370.
- Wan DY, Cerklewski FL, Leklem JE: Increased plasma pyridoxal 5'-phosphate when alkaline phosphatase activity is reduced in moderately zinc-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* (1993), 39: 203-210.
- Wasserstein AG, Stolley PD, Soper KA, Goldfarb S, Maislin G, Agus Z: Case-control study of risk factors for idiopathic calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* (1987), 13: 85-95.
- Welshman SG, McCambridge H: The estimation of citrate in serum and urine using a citrate lyase technique. *Clin Chim Acta* (1973), 46: 243-246.
- Will EJ, Bijvoet OLM: Primary Oxalosis: Clinical and biochemical response to high-dose pyridoxine therapy. *Metabolism* (1979a), 28: 542-548.
- Will EJ, Bijvoet OLM: Pyridoxine therapy of adulte primary oxalosis. *Proc EDTA* (1979b), 16: 727-728.
- Williams AK: Vitamin B6: Gas-liquid chromatography of pyridoxol, pyridoxal, and pyridoxamine. *J Agr Food Chem* (1974), 22: 107-109.
- Woodring MJ, Fisher DH, Storvick CA: A microprocedure for the determination of 4-pyridoxic acid in urine. *Clin Chem* (1964), 10: 479-489.
- Yachiku S, Ohkawa T, Takeuchi M, Sonoda T: Studies on the etiology of urolithiasis: effects of vitamin B6 and vitamin B1 on urinary oxalate excretion. *Hinyokika-kiyo* (1969), 15: 297-303.
- Yasumoto K, Tadera K, Tsiji H, Mitsuda H: Semi-automated system for analysis of vitamin B6 complex by ion-exchange column chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol* (1975), 21: 117-127.
- Yendt ER, Cohanin M: Response to a physiologic dose of pyridoxine in type I primary hyperoxaluria. *N Engl J Med* (1985), 312: 953-957.
- Yoshihara H, Yamaguchi S, Yachiku S: Effect of sex hormones on oxalate-synthesizing enzymes in male and female rat livers. *J Urol* (1999), 161: 668-673.
- Zecher O, Lata D, Pfluger H, Schreiber V: Nutritional risk factors in urinary stone disease. *J Urol* (1981), 125: 51-84.

## 7 ANHANG

### 7.1 Informationsmappe Proteinbelastung

# Informationsmappe

• für



## **MENÜVORSCHLÄGE Phase 1**

### **↪ Austauschmenu für Mittagessen**

#### **Mittagessen Nr. 1**

Chines. Nudelpfanne aus:  
gek. Teigwaren  
Champignon, Peperonistreifen  
Lauchstreifen  
seperat: Pouletbrust mit Bratensauce  
Grüner Salat mit Radieschen  
Dressing

#### **Mittagessen Nr. 2**

Fischfilet Zitronensauce  
Schnittlauchkartoffeln  
Rüebli gedünstet  
Blattsalat mit Dressing

#### **Mittagessen Nr. 3**

Reispfanne aus:  
gek. Reis, Rinderhack,  
diverses Gemüse und gek. Reis  
Chiccoreésalat mit Dressing

#### **Mittagessen Nr. 4**

Fleischspiessli  
Naturalsauce/Fleischsauce  
  
Polenta  
Mischgemüse (Rüebli, Blumenkohl, Mais;  
Nüsslisalat mit Dressing

#### **Mittagessen Nr. 5**

Schnitzel mit Pilzsauce  
Hörnli  
Zucchetti mit Peperoni gedünstet  
Grüner Salat mit Dressing

↪ Menge siehe Tagesplan
-------------------------

## MENÜVORSCHLÄGE für Phase 1

### ☞ Austauschmenu für Abendessen

#### Abendessen Nr. 1

Käse  
Forellenfilet geräuchert  
Meerrettich geraffelt, Zitronenschnitze,  
Zwiebelringe; Rohkost: Gurke etc.  
Brot  
Margarine

#### Abendessen Nr. 2

Gemüsesalat aus: Käse &  
einem gekochtem Ei  
Rohkost nach Belieben  
Vollkorntoast, Margarine /Butter

#### Abendessen: Nr 3

Gemüsequark: aus Quark mit Gemüse-  
sorten -nach Belieben  
Bündnerfleisch  
Gschwellti  
Rohkost

#### Abendessen Nr. 4

Hüttenkäse mi frischen Kräutern  
magerer Schinken (roh, gekocht)  
Cornichons, Tomatenschnitze  
Brot & Butter

#### Abendessen Nr. 5

Farmersalat aus: Thon Rosé (i. Wasser) &  
Fetakäse & Tomaten, Gurken, Peperoni, Pilze  
Dressing  
Brot & Butter

#### Abendessen Nr. 6

Rohschinken  
Käse  
Melonenschnitze  
Brot & Butter





## Tagesplan für Phase 1 (d1-d5)

### Frühstück

Tee oder Kaffee	nach Belieben	
Brot	3 Scheiben	125-150 g
oder		
Getreideflocken:	6-7 EL	60-75g
<hr/>		
Butter/Margarine:	1-2 TL	ca. 10 g
Konfitüre/Honig	1-2 TL	ca. 25 g
<hr/>		
Milch	1 Glas	2 dl
oder		
Joghurt	1 Becher	180 g
oder		
Käse	1 Zündholzkästligrösse	20 -40 g

### Znüeni

Frische Früchte (ausser Mango, Rhabarber)	1 Portion	200g
--	-----------	------



## Tagesplan für Phase 1 (d1-d5)

### Mittagessen

Brot	3 Scheiben	125-150 g
oder		
Kartoffeln (Salzkartoffeln, Gschweiltli, Stocki)	300 g	
oder		
Pommes frites	150 g	
oder		
Reis, Teigwaren	250 g (gekocht)	75 g (roh)
oder		
Hirse, Mais (Polenta), Griess	300 g (gekocht)	75 g (roh)
<hr/>		
Salat (ohne Chicoree, Löwenzahn)	1 Portion	40 g
Gemüse (ohne Spinat, Mangold/Krautstiel, Rauden, Bohnen)	1 Portion	
Salatsauce		
<hr/>		
Fleisch, mager	80-100 g	
oder		
Fisch, mager	100-120 g	
Sauce/Jus		
<hr/>		
Bratfett	1 TL	
Salatöl	1 TL	

### Zvieri

FrISChe Früchte (ausser Mango, Rhabarber)	1 Portion	200g
--	-----------	------



## Tagesplan für Phase 1 (d1-d5)

### Abendessen

Brot oder Kartoffeln (Salzkartoffeln, Gschwellti, Stocki)	3 Scheiben 300 g	150 g
Salat (ohne Chicoree, Löwenzahn) oder Rohkostgemüse (ohne Spinat, Mangold/Krautstiel, Renden, Bohnen)	1 Portion	40 g 1 Portion
Fisch, mager (z.B. Thon rosé) oder Aufschnitt z.B. Lyoner, Salami oder Ei		60 g 40 g 1 Stück
und Hartkäse oder Weichkäse oder Quark		20-30 g 50g 200 g
Streichfett	1-2TL	10 g

### Spätmahlzeit

1 Joghurt Darvida oder Getreideflocken	1 Becher 1-2 EL	180g 30g 30 g
---	--------------------	---------------------



## Tagesplan für Phase 2 (d6-d10)

### Frühstück

Tee oder Kaffee	nach Belieben	
Brot	1- 1 ½ Scheiben	80 g
<u>oder</u>		
Getreideflocken:	3-4 EL	40g
<hr/>		
Butter/Margarine:	1 TL	5 g
Konfitüre/Honig	1-2 TL	ca. 25 g
<hr/>		
Milch	1 Glas	2 dl
<u>oder</u>		
Joghurt	1 Becher	180 g
<u>und</u>		
Käse	1 Zündholzkästli-grösse	30 g
<hr/>		
Bündnerfleisch, Schinken, Rauchfleisch	1 Portion	50g

### Znüeni

Frische Früchte (ausser Mango, Rhabarber)	1 Portion	200g
--	-----------	------



## Tagesplan für Phase 2 (d6-d10)

### Mittagessen

Brot	1 - 1 ½ Scheiben	80 g
<u>oder</u>		
Kartoffeln (Salzkartoffeln, Gschwellti, Stocki)		150 g
<u>oder</u>		
Reis, Teigwaren	100 g (gekocht)	30g (roh)
<u>oder</u>		
Hirse, Mais (Polenta), Griess	150 g (gekocht)	40 g (roh)
<hr/>		
Salat (ohne Chicoree, Löwenzahn)	1 Portion	40 g
Gemüse(ohne Spinat, Mangold/Krautstiel, Ränden, Bohnen)	1 Portion	
<hr/>		
Fleisch, mager (Steak, Filet, Plätzli...)		350 g
Rohgewicht)		
<u>oder</u>		
Fisch (Lachsschnitte, Fischfilet...)		400 g (Rohg.)
Bratensauce / Kräuterbutter		
<hr/>		
Bratfett	1 TL	
Salatöl	1 TL	

### Zvieri

Frische Früchte	1 Portion	200g
(ausser Mango, Rhabarber)		
<hr/>		
1 Joghurt <u>oder</u> 1 Glas Milch		



## Tagesplan für Phase 2 (d6-d10)

### Abendessen

Brot	1 - 1 ½ Scheiben	80 g
oder		
Kartoffeln (Salzkartoffeln, Gschwellti, Stockli)		180 g
<hr/>		
Salat (ohne Chicoree, Löwenzahn) oder	1 Portion	40 g
Rohkostgemüse (ohne Spinat, Mangold/Krautstiel, Renden, Bohnen)	1 Portion	
<hr/>		
Fleisch, mager (Rohgewicht)		300 g
oder		
Fisch, mager (Rohgewicht)		350 g
<hr/>		
Streichfett	1-2 TL	10 g
Salatöl	1 TL	

### Spätmahlzeit

Trockenfleisch		40 g
Brot	1 Scheibe	40 g



### Wichtig

im Verlauf des Tages ausreichend trinken !! - mindestens 2 l besser 3 l am Tag  
erlaubte Getränke: Hahnenwasser, Mineralwasser natur, Kräuter- und Früchtetee,  
 wenig Kaffee, selten Schwarztee

# Wichtig



- Bitte Essprotokolle während der Studienzeit führen
- Bitte Angaben zu der Sorte des Mineralwassers sowie wieviel Alkohol am Tag aufgenommen wurde



# Wichtig

- **bei Hunger:**  
Brot, Teigwaren .....,  
Früchte, Gemüse vermehrt  
essen - bitte kein Fleisch,  
Fisch,  
Milch/Milchprodukte....
- allgemein 3 Portionen  
Milch /Milchprodukte am  
Tag nicht überschreiten





## Anleitung zur Führung eines Essprotokolles

Dieses Essprotokoll dient dazu, ein Bild über Ihre Essgewohnheiten zu erhalten. Zudem gibt es Aufschluß über die Versorgung mit den einzelnen Nährstoffen. Daher ist es wichtig, möglichst genaue Angaben zu machen und alles sofort aufzuschreiben, was den ganzen Tag über Ihre Lippen geht. Um Ihnen aber das Führen zu erleichtern kurz einige Informationen:

<i>Fleisch, Fisch, Tofu Milchprodukte</i>	Möglichst mit Grammangabe; achten Sie beim Einkaufen auf das Gewicht, und teilen Sie es durch die Anzahl Portionen. Merken Sie sich ebenfalls den Fettgehalt oder die genaue Bezeichnung (z.B. Drinkmilch). Eine Käseportion in der Größe einer Zündholzschachtel wiegt ca 30 g.
<i>Fett, Öl und Butter</i>	Angabe in EL oder TL
<i>Brot</i>	Möglichst mit Grammangabe; wiegen Sie die Brotscheiben 2-3 mal ab und merken Sie sich das Gewicht. Schreiben Sie zusätzlich hinzu um welche Brotsorte es sich handelt (Vollkorn-, Weißbrot).
<i>Kartoffeln</i>	Stückzahl und Größe (klein, mittel, groß)
<i>Reis, Kartoffelstock Polenta, Teigwaren</i>	Angaben in gehäuften Eßlöffeln (gekocht)
<i>Gemüse</i>	Portionen, genaue Grammangaben sind nicht nötig
<i>Obst</i>	Stückzahl und Bezeichnung klein, mittel, groß
<i>Getränke</i>	Deziliterangaben; abschätzen nach Glas- oder Tasseninhalt (auch Wasser notieren).
<i>Fertigprodukte</i>	Gewichts- und Nährwertangaben auf der Packung entnehmen
<i>Allerlei</i>	Pro Stück oder Gramm wenn möglich
<i>Zubereitungshinweise</i>	Beispielsweise an Béchamelsauce, ohne Öl, in Teflonpfanne
<i>Zeit ☺</i>	Zeitangabe
<i>Wo</i>	Zu Hause, Restaurant, Kantine, unterwegs, eingeladen

Das exakte und ehrliche Führen eines Protokolls erfordert Zeit und Disziplin, dennoch bitten wir Sie um Ihre sorgfältige Mitarbeit, damit wir auf Ihre speziellen Ernährungsgewohnheiten eingehen können.

Ernährungsberatung  
Medizinische Poliklinik  
Inselspital  
3010 Bern  
☎ 031 632 38 95  
oder 632 25 25

Name .....  
Vorname .....  
Adresse .....  
Geb. Dat. ....

Beispiel für ein

**Ernährungsprotokoll**

Immer sofort alles notieren!

Datum: .....

Uhrzeit:	Wo:	Essen: was / wieviel?	Trinken: was / wieviel?
07.10	zH	60 g Ruchbrot	1 dl Vollmilch 2 dl Kaffee
08.20			2 dl Valserwasser
09.30	R	1 Gipfeli	1.5 dl Kaffee 2 Kaffeerahm 1 Würfelzucker
12.15	K	150 g Schweinskotelette 2 EL Bratensauce 4 EL Röstli 1 Portion Bohnen 3 Schokoladenguetzli	2.5 dl Crèmesuppe 3 dl Henniez 1.5 dl Kaffee 2 Kaffeerahm 1 Würfelzucker
15.30	u	30 g Erdnüssli	3 dl Coca-Cola
18.30	zH	80 g Ruchbrot 1 EL Butter 40 g Schinken 1 Salzgurke 1/2 Ei 180 g Erdbeerjoghurt	4 dl Schwarztee ohne Zucker
20.00			2 dl Cola light
20.45	zH	1 mittelgrosser Apfel	
22.30			3 dl Bier
Leer lassen			

zH = zu Hause, R = Restaurant, K = Kantine, u = unterwegs, e = eingeladen

## 7.2 Curriculum vitae

### Personalien:

Name, Vorname	Kälin Aebi, Agnes
Geburtsdatum	17.09.1964
Geburtsort, -kanton	Liestal, Kanton Baselland
Heimatort, -kanton	Einsiedeln, Kanton Schwyz Aetingen, Kanton Solothurn
Nationalität	Schweizerin
Adresse	Käppelgasse 16, 4125 Riehen
Beruf	Eidg. dipl. Apothekerin
Zivilstand	Verheiratet

### Ausbildung:

Universität Basel	Doktorandin, Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Hauptfach: Pharmazie	seit 06.11.1996
Universität Basel	Diplom als Eidg. dipl. Apothekerin	02.11.1995
Universität Basel	Studentin, Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Hauptfach: Pharmazie	1987-1995
Universität Basel	Studentin, Medizinische Fakultät Hauptfach: Humanmedizin	1985-1987
Gymnasium Liestal	Maturitätszeugnis nach Typus C	23.09.1985
Gymnasium Liestal	Gymnasiastin	1981-1985

#### An der Ausbildung beteiligte Dozenten:

Barras JP, Bartels H, Beglinger HC, Bickle TA, Bienz KA, Brenner HR, Brupacher R, Bucher U, Bühler FR, Burger MM, Bürki K, Caroni P, De Libero G, Dettli LC, Eberle AN, Eckert V, Eppenberger U, Erb P, Fallab S, Freyvogel TA, Fuhr P, Gehring WJ, Gisler RH, Gratwohl AA, Gratzl O, Güntert TW, Gyr N, Haefeli WE, Haegeli A, Hahn AWA, Harder F, Herrmann A, Hofbauer KG, Huber P, Hunziker W, Hynes N, Iberg N, Imanidis G, Kappos L, Keller U, Kress A, Leuenberger H, Linde HHA, Lüdin E, Maître L, Marbet GA, Melchers GF, Meyer J, Meyer UA, Monard D, Moroni C, Nicholls JG, Nissen C, Olpe HR, Otten U, Perruchoud AP, Pfeilschifter J, Pfister M, Plattner GR, Probst A, Rochlitz C, Rogers S, Rolink AG, Ruegg MA, Ruegg U, Ruftli T, Schaffner W, Schifferli J, Scholer A, Seelig J, Seiler HG, Séquin U, Sigel H, Spornitz UM, Stamm W, Steck AJ, Strazewski P, Tamm C, Thiel G, Tichelli A, Tyndall A, van Hoogevest P, Volante S, von Hahn HP, Vozeh S, Walz D, Weiss P, Wirz-Justice A, Zimmerli W, Zumstein A.

#### Weiterbildung:

Universität Bern	Nachdiplomkurs Angewandte Statistik	10.1996-09.1997
------------------	--	-----------------

#### Praktische Erfahrung:

F. Hoffmann-La Roche AG, Basel	Global Study Manager, Study Management Team Leader	Seit 07.2004
Covance Clinical and Periapproval Services Ltd., Maidenhead (UK) F. Hoffmann-La Roche AG, Basel	Global Clinical Operations Associate	04.2002-06.2004
Covance Clinical and Periapproval Services Ltd., Maidenhead (UK) Roche Products Ltd., Welwyn Garden City (UK) Roche Clinical Pharmacology Unit, Basel	Pharmacology Study Manager	04.2001-03.2002
Medizinische Universitäts- poliklinik, Einheit für Osteoporose, Inselspital, Bern	Doktorandin	04.1996-06.2000

Apotheke Liebrüti, Kaiseraugst	Apotheker-Assistentin	03.1992-10.1995
Burgfelder-Apotheke, Basel		
Engelmann' sche Apotheke,		
Basel Linden-Apotheke, Basel		
Mustermesse-Apotheke, Basel		
St. Clara-Apotheke, Basel		
Tell-Apotheke, Basel		
Burgfelder-Apotheke, Basel	Praktikantin	09.1990-08.1991
Pick Pay AG, Liestal	Kassiererin	11.1986-03.1987
Kantonsspital, Liestal	Schwesternhilfe	10.1985
Kantonsspital, Liestal	Praktikantin	07.1984

#### Publikationen:

- Kaelin A, Casez JP, Jaeger Ph: Vitamin B6 metabolites in idiopathic calcium stone formers: no evidence for a link to hyperoxaluria. *Urol Res* (2004), 32: 61-68.
- Nguyen QV, Kaelin A, Drouve U, Casez JP, Jaeger Ph: Sensitivity to meat protein intake and hyperoxaluria in idiopathic calcium stone formers. *Kidney Int* (2001), 59: 2273-2281.
- Kaelin A, Nguyen QV, Casez JP, Jaeger Ph: Deficient vitamin B6 and hypersensitivity to dietary protein in idiopathic calcium stone formers: causal relationship? In: Rodgers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM (Hrsg.): *Urolithiasis 2000, Book of Proceedings*. University of Cape Town; Cape Town; (2000) 458-460.
- Kaelin A, Nguyen QV, Casez JP, Jaeger Ph: Deficient vitamin B6 and hypersensitivity to dietary protein in idiopathic calcium stone formers: causal relationship? In: Rodgers A, Hibbert B, Durrbaum D, Baretta G, Durbach J (Hrsg.): *Urolithiasis 2000, Book of Abstracts*. University of Cape Town; Cape Town; (2000) 17.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers with hyperoxaluria: further evidence. In: Borghi L, Meschi T, Briganti A, Schianchi T, Novarini A (Hrsg.): *Kidney Stones*. Editoriale Bios; Cosenza; (1999) 449-451.
- Nguyen QV, Kaelin A, Drouve U, Casez JP, Jaeger Ph: Hypersensitivity to meat protein intake accounts for mild metabolic hyperoxaluria (MMH) in idiopathic calcium stone formers (ICSF). *J Am Soc Nephrol* (1999), 10: A3102: 613A.
- Nguyen QV, Kaelin A, Casez JP, Lippuner K, Jaeger Ph: Hypersensibilité aux protéines carnées et hyperoxalurie métabolique légère des patients néphrolithiasique idiopathiques récidivants. *Néphrologie* (1999), 20: A351: 298.

- Kaelin A, Jaeger Ph: Vitamin B6 in male idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria (HO): a comparison with healthy men. Eur J Intern Med (1999), 10: S152.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Vitamin-B6-Stoffwechsel bei Nierensteinpatienten mit idiopathischer Hyperoxalurie und Gesunden im Vergleich. Schweiz Med Wochenschr (1999), 129: 32S.
- Kaelin A, Mosimann R, Farina K, Vaucher A, Haueter G, Jaeger Ph: Further evidence for disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria (HO). Kidney Int (1999), 55: 1154.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Further evidence for disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria. J Am Soc Nephrol (1998), A2839: 556.

#### Vorträge:

- Kaelin A, Nguyen QV, Casez JP, Jaeger Ph: Deficient vitamin B6 and hypersensitivity to dietary protein in idiopathic calcium stone formers: causal relationship. 9th International Symposium on Urolithiasis, Kapstadt, Südafrika, 14. Februar 2000.
- Kaelin A, Jaeger Ph: A disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria (HO): results of a short-term treatment. 8th European Symposium on Urolithiasis, Parma, Italien, 10. Juni 1999.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Vitamin B6 in male idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria (HO): a comparison with healthy men. European Federation of Internal Medicine, 2nd Congress, Florenz, Italien, 14. Mai 1999.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Vitamin-B6-Stoffwechsel bei Nierensteinpatienten mit idiopathischer Hyperoxalurie und Gesunden im Vergleich. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Innere Medizin, Basel, Schweiz, 14. April 1999.
- Kaelin A, Mosimann R, Farina K, Vaucher A, Haueter G, Jaeger Ph: Néphroli-thiase calcique idiopathique (NCI) et recherche d'un défaut lithogène sous-jacent: nouvelles évidences pour un désordre du métabolisme de la vitamine B6 en cas d'hyperoxalurie (HO). Journées annuelles de néphrologie, Paris, Frankreich, 2. Oktober 1998.

#### Posterpräsentationen:

- Nguyen QV, Kaelin A, Drouve U, Casez JP, Jaeger Ph: Hypersensitivity to meat protein intake accounts for mild metabolic hyperoxaluria (MMH) in idiopathic calcium stone formers (ICSF). USA, 1999.
- Nguyen QV, Kaelin A, Casez JP, Lippuner K, Jaeger Ph: Hypersensibilité aux protéines carnées et hyperoxalurie métabolique légère des patients néphrolithiasique idiopathiques récidivants. Société de Néphrologie et So-

- ciété francophone de Dialyse, 1<sup>ère</sup> Réunion commune, Lausanne, Schweiz, 6.-8. Oktober 1999.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Vitamin B6 metabolism is often disturbed in idiopathic calcium stone formers with hyperoxaluria. Workshop on new horizons in the pathogenesis, treatment and cure of hyperoxaluria, oxalosis and the oxalate stone diseases, Bethesda, Maryland, USA, 8. Dezember 1998.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers (ICSF): The reason for hyperoxaluria (HO)? Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie, Zürich, Schweiz, 4. Dezember 1998.
- Kaelin A, Jaeger Ph: Further evidence for disturbed vitamin B6 metabolism in idiopathic calcium stone formers (ICSF) with hyperoxaluria (HO). Tag der Klinischen Forschung des Inselspitals, Bern, Schweiz, 5. November 1998.
- Kaelin A, Mosimann R, Farina K, Vaucher A, Haueter G, Jaeger Ph: Mehr Evidenz für einen gestörten Vitamin-B6-Stoffwechsel beim idiopathischen Nierensteinleiden mit Hyperoxalurie. Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie, Basel, Schweiz, 5. Dezember 1997.
- Kaelin A, Hess B, Jaeger Ph: Pyridoxal 5'-phosphate serum concentration before and after pyridoxine loading in idiopathic calcium stone-formers: a way to understand idiopathic hyperoxaluria? 4th Workshop on Primary Hyperoxaluria, Turin, Italien, 7. März 1997.

